

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Χαρακτηρισμός των μορίων που αλληλεπιδρούν με τον  
μιτοχονδριακό υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών με την μέθοδο  
φασματοσκοπίας μάζας – Λειτουργική συσχέτιση

Characterization of the mitochondrial glucocorticoid receptor  
interacting proteins by mass spectrometry – Functional  
correlation

Επιμέλεια Εργασίας: Σιουτοπούλου Αικατερίνη

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Ψαρρά Άννα Μαρία

ΛΑΡΙΣΑ 2015

~ 1 ~

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας (TBB), στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Υπεύθυνη Καθηγήτρια:

**Ψαρρά Άννα-Μαρία**, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας TBB, Π.Θ.

Τριμελής Επιτροπή:

**Ψαρρά Άννα-Μαρία**, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας, TBB, Π.Θ.

**Σαμιωτάκη Μαρτίνα**, Λειτουργικός Επιστήμονας, Ινστιτούτο «Αλέξανδρος Φλέμινγκ».

**Λεωνίδας Δημήτριος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, TBB, Π.Θ.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής και ιδιαίτερα την κα Άννα Μαρία Ψαρρά για την πολύτιμη καθοδήγηση και συμβουλές της σε καθημερινή βάση και τον ΚΟ Δημήτριο Λεωνίδα για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον υποψήφιο διδάκτωρ Βύρων Γοργογιέτα για την υπομονή του και βοήθειά του καθώς και όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για την ομαλή συνεργασία.

## Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	5
SUMMARY .....	7
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 Υποδοχείς.....	8
1.1.1 Γενικά .....	8
1.1.2 Διάκριση υποδοχέων-εξωκυτταρικών σημάτων .....	8
1.1.3 Η υπεριοικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων .....	9
1.2 Στεροειδείς ορμόνες.....	13
1.2.1 Γενικά .....	13
1.2.2 Τα Γλυκοκορτικοειδή.....	13
1.2.3 Φυσιολογικός ρόλος των γλυκοκορτικοειδών .....	14
1.2.4 Ρύθμιση της έκκρισης γλυκοκορτικοειδών .....	15
1.2.5 Σύνδρομα Cushing's και Addison's .....	17
1.3 Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών GR.....	17
1.3.1 Δομή .....	17
1.3.2 Το κυτταροπλασματικό σύμπλοκο του άπο-υποδοχέα .....	19
1.3.3 Μετατόπιση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα .....	20
1.3.4 Διμερισμός του GR και πρόσδεσή του υποδοχέα σε αλληλουχίες του DNA .....	20
1.3.5 ΘΕΤΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ .....	23
1.3.6 ΑΡΝΗΤΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ.....	24
1.3.7 Μη γονιδιωματικές δράσεις του GR .....	26
1.3.8 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις.....	27
1.4 ΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟ .....	28
1.4.1 Γενικά .....	28
1.4.2 Η δομή των μιτοχονδρίων .....	28
1.4.3 Οι αντιδράσεις του μεταβολισμού που επιτελούνται στο μιτοχόνδριο.....	29
1.4.4 Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα .....	29
1.4.5 Η μεταγραφή του μιτοχονδριακού γονιδιώματος.....	31
1.4.6 Ρόλος των μιτοχονδριακών ενζύμων στον μεταβολισμό.....	31
1.5 Ο Μιτοχονδριακός υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών (mitochondrial Glucocorticoid Receptor, mtGR) .....	35

1.5.1	Γενικά .....	35
1.5.2	Ρόλος του μιτοχονδριακού GR στη μεταγραφή των μιτοχονδρίων και η επιρροή του στην έκφραση των OXPHOS ενζύμων .....	35
1.5.3	Ρόλος του μιτοχονδριακού υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στην μεταγραφή γονιδίων .....	38
1.5.4	Ρόλος του μιτοχονδριακού υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στην απόπτωση .....	38
1.6	ΚΑΡΚΙΝΟΣ.....	39
1.6.1	Γενικά .....	39
1.6.2	Χαρακτηριστικά καρκινικών κυττάρων .....	39
1.6.3	Μεταβολισμός καρκινικών κυττάρων - Warburg phenomenon .....	40
1.6.4	Ο ρόλος του συμπλόκου της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης στον φαινότυπο των καρκινικών κυττάρων. ....	43
2	ΣΚΟΠΟΣ.....	44
3	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	45
3.1	Υλικά .....	45
3.1.1	Διαλύματα .....	45
3.1.2	Χημικά .....	47
3.1.3	Αντισώματα .....	48
3.1.4	Όργανα .....	48
3.2	Μέθοδοι.....	48
3.2.1	Κυτταροκαλλιέργειες .....	48
3.2.2	Καλλιέργεια κυττάρων HepG2 mtGFPGR.....	49
3.2.3	Ανακαλλιέργεια μονόστοιβης καλλιέργειας με θρυψίνη (θρυψινοποίηση): .	50
3.2.4	Απόψυξη κυττάρων.....	50
3.2.5	Ψύξη κυττάρων.....	51
3.2.6	Κλασμάτωση για απομόνωση μιτοχονδρίων .....	51
3.2.7	Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών των μιτοχονδρίων των HepG2mtGFRGR ....	52
3.2.8	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών σε διάλυμα (μέθοδος Bradford) 54	
3.2.9	Διαχωρισμός πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (SDS page) .....	55
3.2.10	Silver Staining για 2D gels συμβατό με φασματοφωτομετρία μάζας (Mass Spectrometry).....	58
3.2.11	Προσδιορισμός πρωτεϊνών με την μέθοδο της φασματοφωτομετρίας μάζας (mass spectrometry).....	59

3.2.12	Ανάλυση αποτελεσμάτων MS με την μέθοδο Label-free quantification .....	60
3.2.13	DAVID Gene Functional Classification Tool .....	61
4	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	61
4.1	Αποτελέσματα μεθόδου Bradford.....	61
4.2	Αποτελέσματα από την διαδικασία ανίχνευσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Silver staining .....	62
4.2.1	Αποτελέσματα χρώσης πηκτής με τη μέθοδο Silver staining του 1 <sup>ου</sup> πειράματος .....	62
4.2.2	Αποτελέσματα χρώσης πηκτής με τη μέθοδο Silver staining του 2 <sup>ου</sup> πειράματος .....	62
4.3	Αποτελέσματα της ανάλυσης με φασματογράφο μάζας (Mass spectrometry, MS) 63	
4.3.1	Αποτελέσματα MS ανάλυσης από το 1 <sup>ο</sup> πείραμα .....	63
4.3.2	Αποτελέσματα MS ανάλυσης από το 2 <sup>ο</sup> πείραμα .....	72
4.3.3	Ομαδοποίηση των κοινών μορίων των δειγμάτων 2F8.....	79
4.3.4	Ανάλυση αποτελεσμάτων MS ανάλυσης με τη μέθοδο LFQ .....	79
4.3.5	Κατηγοριοποίηση ως προς τη βιολογική δράση μορίων και απεικόνισή των μονοπατιών που συμμετέχουν με το πρόγραμμα DAVID Gene Functional Classification Tool. 82	
4.3.6	Διαγραμματική απεικόνιση όλων των μορίων που αλληλεπιδρούν με τον mtGR. 88	
5	ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	89
6	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	92

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα γλυκοκορτικοειδή ανήκουν στην κατηγορία των στεροειδών ορμονών και ελέγχουν ποικίλες λειτουργίες του οργανισμού. Επηρεάζουν τον μεταβολισμό, έχουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και δρουν ενάντια στον πολλαπλασιασμό και στην αγγειογένεση πολλών τύπων καρκίνων. Όλα τα γλυκοκορτικοειδή, φυσικά και συνθετικά, μεταδίδουν τις επιδράσεις τους μόνο μέσω της σύνδεσής τους με τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR). Ο GR είναι ένας προσδετοεξαρτώμενος μεταγραφικός παράγοντας της οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων. Μέσω εναλλακτικού ματίσματος δημιουργούνται δύο κύριες ισομορφές, η hGRα και η hGRβ. Απουσία ορμόνης, ο GR εδρεύει στο κυτταρόπλασμα ως ανενεργό σύμπλοκο, το σύμπλοκο του απο-υποδοχέα. Πολυάριθμες μελέτες έχουν επιβεβαιώσει τον

μηχανισμό δράσης του GR μέσω του γονιδιωματικού μονοπατιού σηματοδότησής του. Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό, η σύνδεση της ορμόνης μετατρέπει τον υποδοχέα σε ενεργό μεταγραφικό ρυθμιστή, ο οποίος εισέρχεται στον πυρήνα όπου αναγνωρίζει ειδικές DNA αλληλουχίες, τα στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (GREs), τα οποία με τη σειρά τους ελέγχουν τη μεταγραφή.

Τα γλυκοκορτικοειδή επηρεάζουν και την μιτοχονδριακή σύνθεση RNA. Τα μιτοχόνδρια είναι τα κύρια οργάνδια παροχής ενέργειας του κυττάρου μέσω μιας αλληλουχίας αντιδράσεων ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS). Είναι γνωστό ότι κάποια OXPHOS γονίδια κωδικοποιούνται από το πυρηνικό γονιδίωμα και κάποια από το μιτοχονδριακό. Μία σειρά πειραματικών δεδομένων επίσης αποδεικνύει ότι τα γλυκοκορτικοειδή επηρεάζουν έμμεσα τη μεταγραφή των μιτοχονδριακών OXPHOS, μέσω ενεργοποίησης της μεταγραφής των πυρηνικών OXPHOS γονιδίων καθώς και των μιτοχονδριακών μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι στη συνέχεια μεταφέρονται στα μιτοχόνδρια, όπου ελέγχουν την μιτοχονδριακή μεταγραφή. Ο καθ. Σέκερης και οι συνεργάτες του παρατήρησαν ότι τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν να δράσουν και με έναν άμεσο τρόπο στη μιτοχονδριακή μεταγραφή πέραν του έμμεσου πυρηνικού μονοπατιού. Αυτή η υπόθεση στηρίχθηκε από την ανακάλυψη του GR στα μιτοχόνδρια διαφόρων τύπων κυττάρων καθώς και ομόλογων αλληλουχιών με τα GREs στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Λόγω και των αποπτωτικών ιδιοτήτων των γλυκοκορτικοειδών διεξάγονται στοχευμένες έρευνες ως προς τον ρόλο του μιτοχονδριακού υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στην διαδικασία της απόπτωσης.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκαν τα μόρια που αλληλεπιδρούν με τον μιτοχονδριακό υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών και η αποσαφήνιση της λειτουργικής τους συσχέτισης. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα ηπατοκαρκινώματος HepG2 που υπερεκφράζουν τον μιτοχονδριακό υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (mtGR), τα οποία προϋπήρχαν στο εργαστήριο. Πραγματοποιήθηκε απομόνωση των μιτοχονδρίων, ανοσοκατακρήμνιση του GR και προσδιορισμός των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τον GR στο μιτοχονδριακό περιβάλλον με την μέθοδο της φασματοσκοπίας μάζας. Αποδείχθηκε ότι ο mtGR αλληλεπιδρά άμεσα ή έμμεσα με μόρια που εμπλέκονται σε ποικίλες βιολογικές λειτουργίες, όπως ο μεταβολισμός των λιπαρών οξέων, ο μεταβολισμός της αργινίνης και προλίνης, η γλυκόλυση/γλυκονεογένεση και ο κύκλος του κιτρικού οξέος. Αποδείχθηκε, επίσης, ότι ο mtGR αλληλεπιδρά έντονα με τα ένζυμα που συμμετέχουν στην παραγωγή ενέργειας μέσω των συμπλόκων των OXPHOS ενζύμων αλλά και των ενζύμων του συμπλόκου της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (PDC). Το τελευταίο εύρημα είναι πολύ σημαντικό καθώς τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από έναν συγκεκριμένο μεταβολικό φαινότυπο (Warburg, 1930), στον οποίο το PDC είναι απενεργοποιημένο. Αυτά τα δεδομένα βοηθούν στην διαλεύκανση του ρόλου του mtGR στον μεταβολισμό των καρκινικών κυττάρων καθώς και δίνουν πληροφορίες για τους μηχανισμούς εισόδου του υποδοχέα στα μιτοχόνδρια. Τέλος, πολλά υποσχόμενο στο κοντινό μέλλον, είναι η ανακάλυψη και

ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων με στόχο πλέον τον μιτοχονδριακό υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών.

## **SUMMARY**

Glucocorticoids belong to the class of steroid hormones and control many functions of the organism. They have a central role in the metabolic reactions, they exert anti inflammatory activities and act against the proliferation and angiogenesis of several cancer types. Both natural and synthetic glucocorticoids transduce their actions by binding to GR. GR is a ligand-dependent transcription factor of the nuclear receptor superfamily. Alternative splicing of GR generates hGR $\alpha$  and hGR $\beta$  isoforms. In the absence of glucocorticoids, the GR resides in the cytoplasm bound to chaperone proteins. Various studies have confirmed the genomic as well as the non genomic actions of glucocorticoids. According to the genomic mechanism of action, upon ligand binding, GR undergoes conformational changes that trigger its translocation to the nucleus where it can bind to specific DNA sequences, the so called glucocorticoid response elements (GREs), regulating target gene transcription.

Glucocorticoids also affect the mitochondrial RNA synthesis. Mitochondria are vital organelles providing the cell with energy by way of oxidative phosphorylation (OXPHOS) in the respiratory chain. Energy production by OXPHOS is such a function, in which both nuclear and mitochondrial encoded enzymes of OXPHOS are needed for the formation of active respiratory complexes. It is assumed that glucocorticoids affect the transcription of the mitochondrial encoded OXPHOS indirectly, by inducing nuclear signals, such as mitochondrial transcription factors, which then regulate transcription of the mitochondrial genome. Prof. Sekeris and his collaborators suggest an additional direct effect of the mitochondrial GR on mitochondrial transcription. This possibility was based on the demonstration of the mitochondrially localized GR and the presence of sequences with strong homology and characteristics of GREs in the mitochondrial genome. Due to the apoptotic nature of glucocorticoids, studies are constantly conducted to shed the light on the role of the mitochondrial GR in apoptosis.

The aim of this study was to characterize mitochondrial glucocorticoid receptor interacting proteins in order to get more insights into the biological role of the mitochondrial glucocorticoid receptor (mtGR) and to clarify their functional correlation. For these purposes, human HepG2 cells stably expressing a mitochondrial targeted GFP-GR fused protein were used. Subcellular fractionation in order to extract mitochondria was conducted as well as immunoprecipitation of GR and determination of the interacting proteins by mass spectrometry analysis. The acquired data sustained the fact that mtGR interacts either directly or indirectly with specific proteins. These proteins participate in various biological functions such as fatty acid metabolism, arginine and proline metabolism, glycolysis, gluconeogenesis and TCA cycle. It was also shown that mtGR strongly interacts with the OXPHOS enzymes and with the enzymes of pyruvate dehydrogenase complex (PDC). This last finding is very

important as cancer cells are characterized by a metabolic phenotype in which PDC is inactive. The data elicited could assist in sorting out the role of mtGR in cancer cells metabolism as well as in getting insight into the import mechanism of the receptor into mitochondria. Finally, it is promising, the discovery and development of new therapeutic approaches targeting the mitochondrial glucocorticoid receptor.

## **1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **1.1 Υποδοχείς**

#### **1.1.1 Γενικά**

Οι υποδοχείς αποτελούν μία εκτενής κατηγορία σηματοδοτικών πρωτεϊνών, οι οποίες υπακούουν στους νόμους και κανόνες που διέπουν σε όλες τις πρωτεΐνες που παίρνουν μέρος στην διακυτταρική επικοινωνία. Για παράδειγμα υφίστανται αλλοστερική ρύθμιση μέσω μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων, ολιγομερισμό και συνεργασία με άλλες πρωτεΐνες μέσω των περιοχών αλληλεπιδράσεις. Η ιδιότητα που διακρίνει τους υποδοχείς από τις άλλες σηματοδοτικές πρωτεΐνες είναι ότι είναι εξειδικευμένες στην αναγνώριση εξωκυτταρικών σημάτων, δρώντας ως αισθητήρια όργανα. Η διακυτταρική επικοινωνία βασίζεται στην παραγωγή ειδικών σημάτων από το σηματοδοτικό κύτταρο, τα οποία καταγράφονται από ένα κύτταρο στόχο. Μέσω αυτού διαβιβάζονται και επεξεργάζονται περαιτέρω μέσω της διαδικασίας μεταγωγής σήματος (Krauss G., 2003).

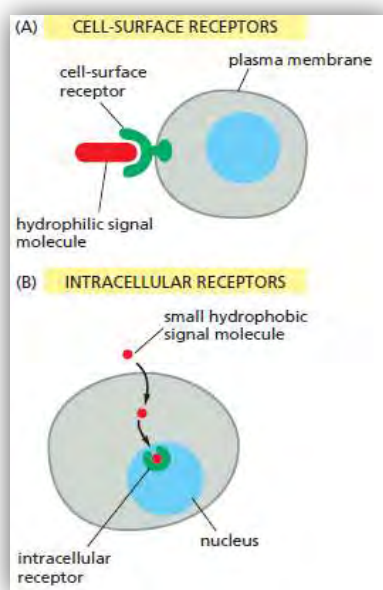
#### **1.1.2 Διάκριση υποδοχέων-εξωκυτταρικών σημάτων**

Ένα τυπικό κύτταρο σε έναν πολυκύτταρο οργανισμό εκτίθεται σε εκατοντάδες διαφορετικά σηματοδοτικά μόρια που βρίσκονται στο περιβάλλον του. Αυτά τα μόρια μπορεί να βρίσκονται ελεύθερα στο εξωκυττάριο υγρό, ενσωματωμένα στην εξωκυτταρική μήτρα, ή δεσμευμένα στην επιφάνεια γειτονικών κυττάρων. Κάθε κύτταρο πρέπει να ανταποκριθεί ειδικά σε αυτό το σύνολο των σημάτων, αγνοώντας κάποια και αντιδρώντας σε κάποια άλλα, σύμφωνα με την λειτουργία του και τις ανάγκες του. Το αν ένα κύτταρο θα ανταποκριθεί σε ένα σηματοδοτικό μόριο εξαρτάται πρώτα από την διαθεσιμότητα ενός πρωτεϊνικού υποδοχέα εξειδικευμένο για το συγκεκριμένο σήμα. Κάθε υποδοχέας συνήθως ενεργοποιείται από ένα μόνο είδος σήματος. Χωρίς τον κατάλληλο υποδοχέα, ένα κύτταρο θα αγνοήσει το σήμα και δεν θα ανταποκριθεί σε αυτό. Παράγοντας μόνο έναν περιορισμένο αριθμό υποδοχέων από τους χιλιάδες πιθανούς, ένα κύτταρο μειώνει το είδος και τον αριθμό των σημάτων που μπορούν να το επηρεάσουν (Alberts B. Et al, 2010).

Τα εξωκυτταρικά σηματοδοτικά μόρια γενικά χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη και μεγαλύτερη κατηγορία αποτελείται από μόρια που είναι πολύ μεγάλα και πολύ υδρόφιλα ώστε να μην μπορούν να διαπεράσουν την πλασματική μεμβράνη του



κυττάρου στόχου. Βασίζονται στην ύπαρξη υποδοχέων στην μεμβράνη του κυττάρου στόχου (**διαμεμβρανικοί υποδοχείς**) μέσω των οποίων μεταβιβάζουν το μήνυμά τους στο εσωτερικό αυτού (Εικόνα 1 Α). Η δεύτερη, και μικρότερη, κατηγορία σημάτων αποτελείται από μόρια τα οποία είναι αρκετά μικρά ή αρκετά υδρόφοβα και άρα ικανά να διαπεράσουν την πλασματική μεμβράνη. Αφού βρεθούν στο εσωτερικό του κυττάρου, συνήθως ενεργοποιούν ενδοκυτταρικά ένζυμα ή δεσμεύονται σε ενδοκυτταρικούς υποδοχείς (**κυτταροπλασματικούς ή πυρηνικούς**) οι οποίοι ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση (Εικόνα 1 Β) (Alberts B. et al, 2010).



**Εικόνα 1.** Εξωκυτταρικά σηματοδοτικά μόρια προσδένονται είτε σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς (Α) είτε σε κυτταροπλασματικούς – πυρηνικούς υποδοχείς (Β). Από Alberts, Essential Cell Biology 3<sup>rd</sup> edition, 2009.

### 1.1.3 Η υπερικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων

#### 1.1.3.1 Γενικά

Οι πυρηνικοί υποδοχείς είναι προσδετο-επαγόμενοι μεταγραφικοί παράγοντες που εξειδικευμένα ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων, τα οποία συμμετέχουν σε βασικές κυτταρικές λειτουργίες όπως μεταβολισμό, ανάπτυξη και αναπαραγωγή (McKenna J. et al, 1999). Οι προσδέτες τους είναι μικρά λιπόφιλα μόρια όπως οι στεροειδείς και οι θυρεοειδείς ορμόνες ή οι ενεργές μορφές της βιταμίνης Α (ρετινοειδή) και βιταμίνη D. Οι ουσίες αυτές κατέχουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη, διαφοροποίηση, μεταβολισμό, αναπαραγωγή και μορφογένεση των ανώτερων οργανισμών και των ανθρώπων (Aranda A. et al, 2001). Οι προσδέτες ορμονικής φύσεως διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη με απλή διάχυση και στην συνέχεια συνδέονται στους αντίστοιχους υποδοχείς στο κυτταρόπλασμα ή στο εσωτερικό του πυρήνα. Με τη σύνδεση σε συγγενή στοιχεία του DNA ο συνδεδεμένος με τον προσδέτη υποδοχέας ενεργοποιεί γονίδια-στόχους και έτσι μεταφέρει το ορμονικό μήνυμα μέσω της τροποποίησης της έκφρασης γονιδίων (Krauss G., 2003). Η κλωνοποίηση των

υποδοχέων των στεροειδών και των θυρεοειδών ορμονών απέδειξε ότι μοιράζονται μία εκτεταμένη ομολογία, γεγονός που οδήγησε στην έρευνα για νέες πρωτεΐνες με παρόμοια δομή. Τα τελευταία χρόνια, έχουν ανιχνευθεί και ταυτοποιηθεί πολλοί πυρηνικοί υποδοχείς, των οποίων οι προσδέτες είναι γνωστοί ή και όχι. Οι συγκεκριμένοι υποδοχείς ονομάζονται *ορφανοί* και πιστεύεται ότι σχετίζονται μεταξύ άλλων με την εμφάνιση διάφορων ασθενειών, όπως η αθηροσκλήρωση, ο καρκίνος, ο διαβήτης και διαταραχές των λιπιδίων. Αυτά τα ευρήματα καθώς και η συνεχόμενη αποσαφήνιση των ορφανών υποδοχέων και εύρεση νέων αγωνιστών και ανταγωνιστών προσδεμάτων, έχουν οδηγήσει στην δημιουργία καινοφανών στρατηγικών για την θεραπεία των προαναφερθέντων ασθενειών (Aranda A. et al, 2001).

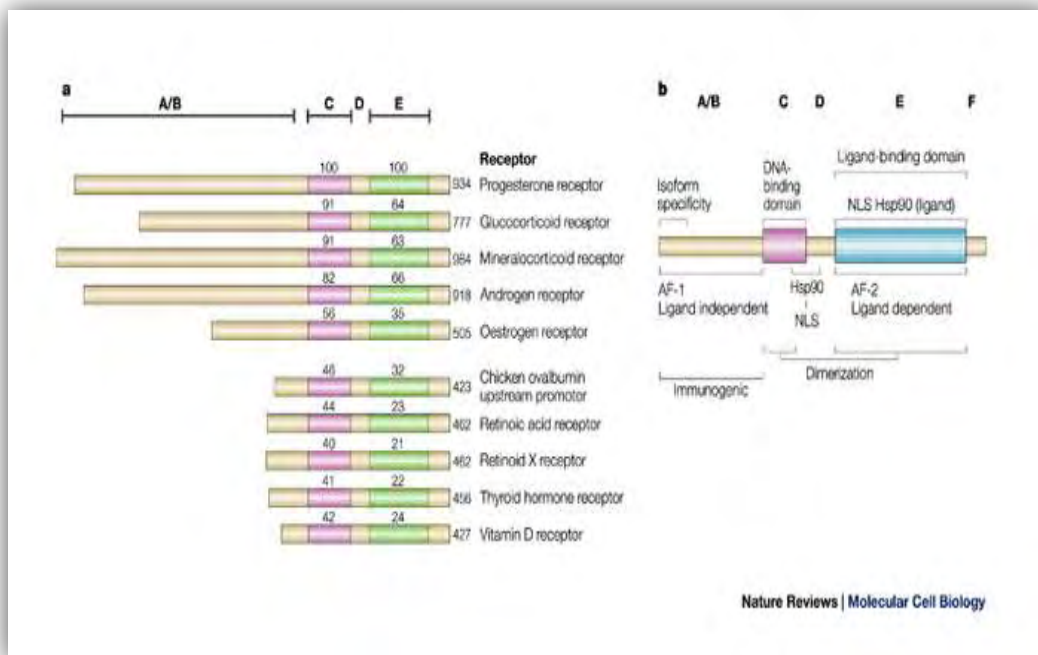
### 1.1.3.2 Δομή

Ένας τυπικός πυρηνικός υποδοχέας αποτελείται από μία μεταβλητή NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή (A/B), μία συντηρημένη περιοχή υπεύθυνη για την πρόσδεση στο DNA (DBD ή περιοχή C) (Aranda A. et al, 2001), μία περιοχή ενδιάμεσου συνδέσμου που λειτουργεί και ως σήμα εντοπισμού του πυρήνα (linker ή περιοχή D)(Gerhard K., 2003) και μία συντηρημένη E περιοχή που περιέχει την περιοχή σύνδεσης του προσδέτη (ή LBD). Μερικοί υποδοχείς περιέχουν και μία COOH- τελική (F) περιοχή, άγνωστης μέχρι στιγμής λειτουργίας. Οι υποδοχείς διαθέτουν επίσης περιοχές απαραίτητες για μεταγραφική ενεργοποίηση (Aranda A. et al, 2001). Περιοχές υπεύθυνες για trans-ενεργοποίηση του υποδοχέα βρίσκονται στις περιοχές: A/B (λειτουργία ενεργοποίησης 1 ή AF-1), E και F (λειτουργία ενεργοποίησης 2 ή AF-2) (Gerhard K., 2003) (Εικόνα 2). Αναλυτικότερα:

- ❖ A/B περιοχή: η περιοχή αυτή εμφανίζει τη μεγαλύτερη ποικιλομορφία και σε μέγεθος και σε αμινοξική αλληλουχία. Πιστεύεται ότι συνεισφέρει στην εξειδικευμένη δράση μεταξύ των διάφορων ισομορφών του υποδοχέα και λόγω αυτού είναι σε θέση να αλληλεπιδρά με παράγοντες οι οποίοι απαντώνται σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους. Επίσης, η A/B περιοχή είναι θέση-στόχος για φωσφορυλίωση από διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια, γεγονός που επηρεάζει σημαντικά τη μεταγραφική ενεργότητα του υποδοχέα (Lazar MA. et al, 1999). Ένα επιπλέον δομικό στοιχείο με λειτουργία trans-ενεργοποίησης εντοπίζεται στο αμινοτελικό άκρο ορισμένων υποδοχέων. Αυτή η περιοχή, που ονομάζεται AF-1, είναι υπεύθυνη για την ιδιόσυστατη προσδετο-ανεξάρτητη ενεργοποίηση της μεταγραφής.
- ❖ DBD (DNA Binding Domain): Η πιο συντηρημένη περιοχή των πυρηνικών υποδοχέων η οποία απονέμει την ικανότητα αναγνώρισης ειδικών αλληλουχιών στόχων και ενεργοποίησης γονιδίων. Περιέχει 9 Cys, καθώς και άλλα κατάλοιπα που είναι συντηρημένα διαμέσου της υπεροικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων και απαιτούνται για την υψηλής συγγένεια πρόσδεσης με το DNA. Η περιοχή αυτή περιλαμβάνει δύο μοτίβα δάχτυλα ψευδαργύρου (zinc fingers) Αμινοξέα που

απαιτούνται για την διάκριση των μοτίβων αναγνώρισης του DNA, βρίσκονται στην βάση του πρώτου δαχτύλου, <<*P box*>>, και άλλα αμινοξέα απαραίτητα για τον διμερισμό του υποδοχέα συναντώνται στο δεύτερο δάχτυλο, <<*D box*>> (Aranda A. et al, 2001).

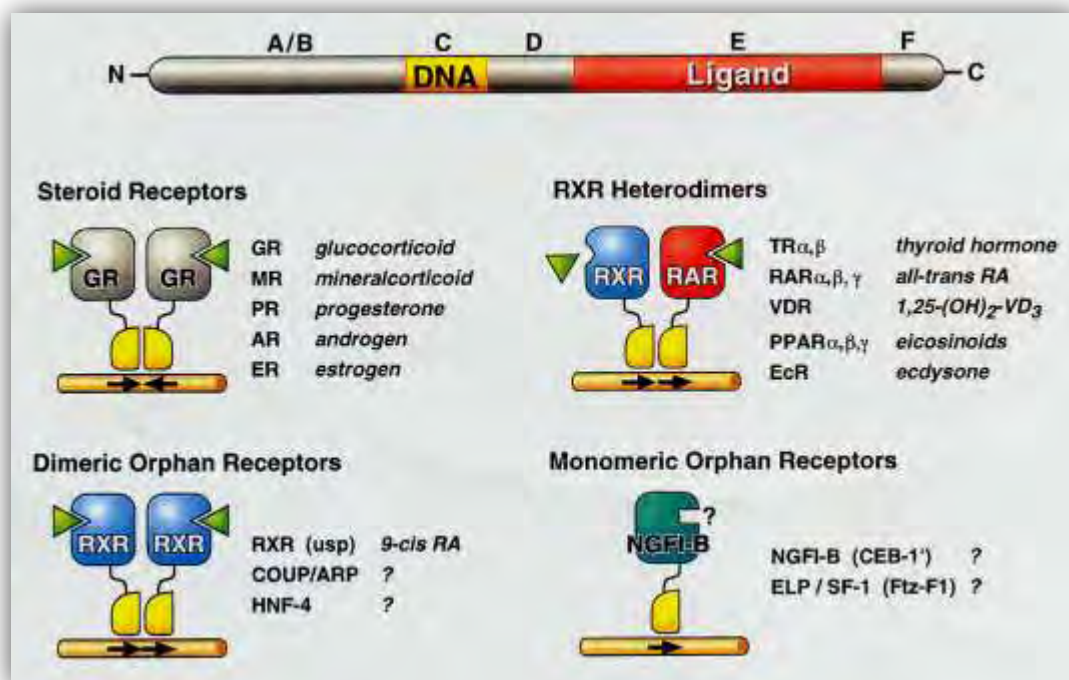
- ❖ D περιοχή: Η συγκεκριμένη περιοχή δεν είναι πολύ συντηρημένη μεταξύ των διαφορετικών υποδοχέων και χρησιμοποιείται σαν *αρμός* (hinge) ανάμεσα στην DBD και στην LBD (βλ. παρακάτω), επιτρέποντας την περιστροφή της DBD. Περικλείει σήματα εντοπισμού στον πυρήνα (Aranda A. et al, 2001).
- ❖ LBD (Ligand Binding Domain): Είναι μία πολυλειτουργική περιοχή, η οποία μεσολαβεί στην πρόσδεση του προσδέτη, στον ομο- ή ετερο-διμερισμό, στην αλληλεπίδραση με τις heat shock proteins, στην προσδετο-εξαρτώμενη μεταγραφική δραστηριότητα και σε κάποιες περιπτώσεις στην αντιστροφή της μεταγραφικής καταστολής από ορμόνες. Επίσης, περιέχει και την AF-2 περιοχή, η οποία είναι υπεύθυνη για την προσετο-εξαρτώμενη ενεργοποίηση της μεταγραφής (Wurtz JM., 1996).



**Εικόνα 2. Βασικά δομικά-λειτουργικά χαρακτηριστικά δύο τύπων πυρηνικών υποδοχέων: στεροειδούς/θυρεοειδούς ορμονών και ρετινοειδούς.** α) Ο αριθμός των αμινοξέων του αμινοτελικού άκρου υποδεικνύει το συγγενικό μέγεθος μεταξύ των ανθρώπινων πυρηνικών υποδοχέων. Η κύρια δομή αποτελείται από 3 περιοχές: A/, C και E. Οι αριθμοί πάνω από τις μπάρες αντιπροσωπεύουν την επι % αμινοξική ομολογία των συναινετικών περιοχών DBD (C) και LBD (E). β) Μερικές σημαντικές λειτουργίες που σχετίζονται με τις διαφορετικές περιοχές των πυρηνικών υποδοχέων. Οι περιοχές C και D περιέχουν τις περιοχές πρόσδεσης του DNA, το ανεξάρτητο από το πρόσδεμα σήμα εντοπισμού του πυρήνα (NLS) και τις λειτουργίες πρόσδεσης και διμερισμού της 90-kDa heat-shock protein (Hsp90). Παρόμοιες προσδετοεξαρτώμενες λειτουργίες μπορούν να ανιχνευθούν και στις περιοχές E και καρβοξυτελική περιοχή F (Nature Reviews Molecular Cell Biology 3, 702-710 (September 2002), Jamshed R. Tata, Signalling through nuclear receptors).

Οι πυρηνικοί υποδοχείς μπορούν να διαχωριστούν σε τέσσερις μεγάλες κατηγορίες, με βάση την δομή των υπομονάδων των υποδοχέων συνδεδεμένων με το DNA και την δομή των HREs (Εικόνα 3):

- Class I: διμερείς υποδοχείς στεροειδών ορμονών π.χ. υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών
- Class II: ετεροδιμερείς υποδοχείς που περιέχουν RXR (retinoid X receptor) π.χ. υποδοχείς της ορμόνης T3 και της βιταμίνης D3
- Class III: διμερείς ορφανοί υποδοχείς
- Class IV: μονομερείς ορφανοί υποδοχείς (Mangelsdorf D. et al, 1995)



**Εικόνα 3. Οι πυρηνικοί υποδοχείς μοιράζονται κοινές δομικές/λειτουργικές περιοχές.** Οι πυρηνικοί υποδοχείς μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε 4 ομάδες ανάλογα

με το πρόσδεμα, την σύνδεση στο DNA και το διμερισμό τους: στεροειδείς υποδοχείς, RXR ετεροδιμερής, ομοδιμερής ή ορφανοί υποδοχείς και μονομερείς ορφανοί υποδοχείς. Τα ερωτηματικά (?) αναφέρονται σε υποδοχείς των οποίων τα προσδέματα δεν είναι γνωστά ακόμα (Mangelsdorf D. et al, 1995).

## **1.2 Στεροειδείς ορμόνες**

### **1.2.1 Γενικά**

Οι στεροειδείς ορμόνες εκκρίνονται από την φλοιώδη μοίρα των επινεφριδίων (γλυκοκορτικοειδή, μεταλλοκορτικοειδή) και από τις γονάδες (ανδρογόνα, οιστρογόνα, προγεστερόνη). Επίσης, στις στεροειδείς ορμόνες συγκαταλέγεται και η βιταμίνη D. Το κοινό πρόδρομο μόριο όλων των στεροειδών ορμονών είναι η χοληστερόλη. Λόγω της λιπόφιλης φύσης τους, μετά την έκκρισή τους στο αίμα, συνδέονται με πρωτεΐνες μεταφοράς του πλάσματος, όπως η τρανσκορτίνη και η αλβουμίνη. Η αδρανοποίησή τους πραγματοποιείται κυρίως στο ήπαρ, στους νεφρούς και στους ιστούς στόχους.

Τα κορτικοστεροειδή (γλυκοκορτικοειδή και αλατοκορτικοειδή) κατέχουν ένα ρόλο κλειδί στην ομοιόσταση του οργανισμού, καθώς επηρεάζουν πολλές λειτουργίες του όπως το μεταβολισμό των υδατανθράκων, των πρωτεϊνών και των λιπιδίων και έχουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (γλυκοκορτικοειδή). Επίσης, επηρεάζουν την ομοιόσταση των ηλεκτρολυτών και την συγκέντρωση του H<sub>2</sub>O (αλατοκορτικοειδή).

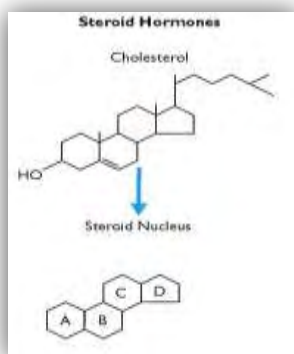
Οι φυλετικές ορμόνες είναι υπεύθυνες για την ανάπτυξη των δευτερευόντων χαρακτηριστικών των οργανισμών, επηρεάζουν την ανάπτυξη του σώματος, την συμπεριφορά, την αναπαραγωγή και την πρόκληση του οίστρου.

Η βιταμίνη D3 (χολοκαλσιφερόλη) προσλαμβάνεται σε μικρές ποσότητες με την τροφή και παράγεται στο δέρμα από πρόδρομες ουσίες με την επίδραση των υπεριωδών ακτινών του ηλιακού φωτός. Η χολοκαλσιφερόλη συμβάλλει στην επάρκεια διαθέσιμου ασβεστίου και φωσφόρου για την ανάπτυξη του σκελετού με τρεις βασικούς μηχανισμούς: 1) αυξάνει την απορρόφηση ασβεστίου και φωσφόρου από το έντερο, 2) αυξάνει τη μετακίνηση του ασβεστίου από τα οστά, αυξάνοντας των αριθμών των οστεοκλαστών και 3) αυξάνει την επαναρρόφηση του ασβεστίου από τα ουροφόρα σωληνάκια του νεφρού.

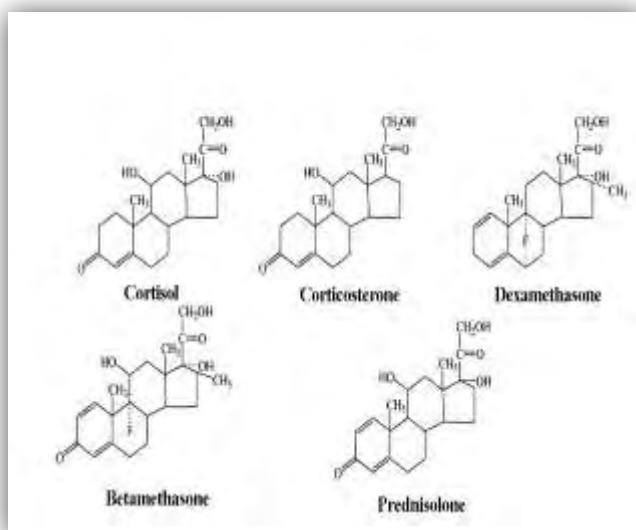
### **1.2.2 Τα Γλυκοκορτικοειδή**

Η κορτιζόνη, η κορτιζόλη και η κορτικοστερόνη είναι τα κυριότερα γλυκοκορτικοειδή.





**Εικόνα 4.** Όλα τα στεροειδή έχουν μία κοινή δομή δαχτυλίου. Οι πλευρικές αλυσίδες και ο χωρικός προσανατολισμός τους προσδίδει εξειδίκευση (Nussey S. et al, 2001).



**Εικόνα 5.** Η δομή κάποιων φυσικών (κορτιζόλη, κορτικοστερόνη) και συνθετικών γλυκοκορτικοειδών.

### 1.2.3 Φυσιολογικός ρόλος των γλυκοκορτικοειδών

Καταρχήν, τα γλυκοκορτικοειδή κινητοποιούν την γλυκόζη στην συστηματική κυκλοφορία. Στο ήπαρ, η κορτιζόλη επάγει την γλυκονεογένεση και καθιστά πιο αποτελεσματική τη δράση άλλων υπεργλυκαιμικών ορμονών (π.χ. γλυκαγόνη, κατεχολαμίνες και αυξητική ορμόνη) στην διάσπαση του γλυκογόνου, με αποκορύφωμα την απελευθέρωση γλυκόζης από τα ηπατοκύτταρα. Η κορτιζόλη, αναστέλλει την πρόσληψη και την χρήση γλυκόζης από τους μύες και τον λιπώδη ιστό μέσω παρέμβασής της στην σηματοδότηση της ινσουλίνης. Επίσης, η ορμόνη προωθεί την αποδυνάμωση των μυών, αφού αυξάνει τον καταβολισμό των πρωτεϊνών και μειώνει τον αναβολισμό τους. Η επίδραση της κορτιζόλης στα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα επιτείνεται παραπέρα μέσω της αύξησης της διάσπασης των τριακυλογλυκερών (TGs) στον λιπώδη ιστό, παρέχοντας έτσι ενέργεια και υποστρώματα στην γλυκονεογένεση. Με τον υπέρμετρο μεταβολισμό των πρωτεϊνών, αυξάνεται η απέκκριση αζώτου με τα ούρα και επάγονται τα ένζυμα του κύκλου της ουρίας (Ortsater H. et al, 2012). Παρατεταμένη έκθεση στα γλυκοκορτικοειδή προκαλεί μία σαν διαβήτη κατάσταση, εξαιτίας της αυξημένης γλυκόζης στο αίμα,

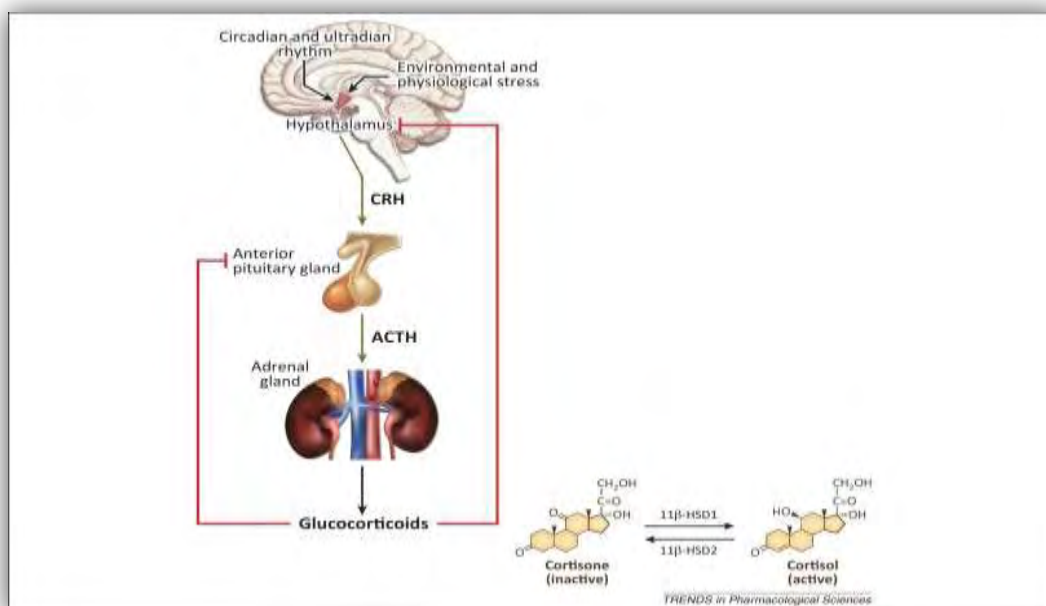
ενώ μειωμένη συγκέντρωση γλυκοκορτικοειδών οδηγεί σε υπογλυκαιμία, σε ελάχιστα αποθέματα γλυκογόνου και σε υπερευαισθησία στην ινσουλίνη.

Εκτός από την επιρροή τους στον μεταβολισμό, τα γλυκοκορτικοειδή αποτρέπουν ή καταστέλλουν την πλήρης φλεγμονώδη αντίδραση του οργανισμού έναντι σε μολυσματικούς, φυσικούς ή ανοσοποιητικούς παράγοντες. Μία κύρια επίδραση των γλυκοκορτικοειδών είναι η αναστολή της στρατολόγησης ουδετερόφιλων και μονοκυττάρων. Συνθετικά γλυκοκορτικοειδή χορηγούνται κατά κόρον για την θεραπεία χρόνιων φλεγμονωδών ασθενειών, όπως το άσθμα, μολύνσεις του δέρματος και των οφθαλμών καθώς και για ανοσοκαταστολή ασθενών που υπόκεινται σε μεταμοσχεύσεις ιστών και οργάνων. Επιπρόσθετα με τις αντιφλεγμονώδεις δράσεις, τα γλυκοκορτικοειδή χρησιμοποιούνται και στην θεραπεία πολλών τύπων καρκίνου, λόγω των ανασταλτικών ιδιοτήτων τους στον πολλαπλασιασμό και την αγγειογένεση (Kadmiel M., Cidlowski J., 2013).

#### **1.2.4 Ρύθμιση της έκκρισης γλυκοκορτικοειδών**

Η έκκριση των γλυκοκορτικοειδών διεγείρεται από την ACTH (επινεφριδιοφλοιοτρόπο ορμόνη ή κορτικοτροπίνη) του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης. Η έκκριση της ACTH με την σειρά της επηρεάζεται από την απελευθερωτική ορμόνη της επινεφριδιοφλοιοτρόπο ορμόνης (CRH) του υποθαλάμου. Η αδρεναλίνη, η οποία εκκρίνεται σε αυξημένες συγκεντρώσεις από την μυελώδη μοίρα των επινεφριδίων σε καταστάσεις stress, διεγείρει την έκκριση της ACTH. Αύξηση της συγκέντρωσης των γλυκοκορτικοειδών προκαλεί μείωση της έκκρισης της ACTH και το αντίστροφο. Αυτός ο μηχανισμός παλίνδρομης ρύθμισης λειτουργεί ανάμεσα και στα γλυκοκορτικοειδή με την CRH (Kadmiel M., Cidlowski J., 2013).

Επιπλέον, στους ανθρώπους τα GCs στην κυκλοφορία του αίματος απαντώνται σε 2 μορφές. Η μη ενεργοποιημένη μορφή (κορτιζόνη) δεν είναι συνδεδεμένη με πρωτεΐνες του πλάσματος, ενώ η ενεργοποιημένη μορφή (κορτιζόλη) βρίσκεται κατά το 95% συνδεδεμένη με γλοβουλίνες που συνδέονται με κορτικοστεροειδή. Η μετατροπή μεταξύ της δραστηκής και μη δραστηκής μορφής πραγματοποιείται από το ενζύμου 11β-OH-δεϋδρογονάση των στεροειδών (11β-HSD) (Ortsater H. et al, 2012). Η δεϋδρογονάση αυτή απενεργοποιεί την κορτιζόλη στους νεφρούς και επιτρέπει στην αλδοστερόνη (αλατοκορτικοειδές) να προσδεθεί στον υποδοχέα της. Ανισορροπία στα επίπεδα των γλυκοκορτικοειδών μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση παθολογικών καταστάσεων γνωστών ως σύνδρομο Cushing's και Addison's.



**Εικόνες 6. Σχηματική αναπαράσταση της ρύθμισης των επιπέδων των γλυκοκορτικοειδών υπό τον άξονα υποθαλάμου – υπόφυσης - επινεφριδίου.** Η σύνθεση και η απελευθέρωση των γλυκοκορτικοειδών είναι κάτω από τη δυναμική κίρκαδική ρύθμιση του υποθαλάμου. Η CRH που εκκρίνεται από τον υποθάλαμο διεγείρει την απελευθέρωση της ACTH που απελευθερώνεται από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης. Με την σειρά της, η ACTH πυροδοτεί τη σύνθεση και έκκριση της κορτιζόλης από την φλοιώδη μούρα των επινεφριδίων στην κυκλοφορία του αίματος. Στην κυκλοφορία, η περισσότερη ποσότητα κορτιζόλης παραμένει συνδεδεμένη με τις γλοβουλίνες που προσδένουν κορτικοστεροειδή (Kadmiel M., Cidlowski J., 2013).



### 1.2.5 Σύνδρομο Cushing's και Addison's

Το σύνδρομο Cushing's είναι μία ορμονική διαταραχή, η οποία προκαλείται από παρατεταμένη έκθεση των ιστών σε υψηλά επίπεδα κορτιζόλης. Είναι ένα σχετικά σπάνιο σύνδρομο και πλήττει κυρίως ενήλικες ηλικίας 20-50 ετών. Άτομα παχύσαρκα και με διαβήτη τύπου 2, καθώς και άτομα με αρρυθμίες στην γλυκόζη του αίματος και στην πίεση του αίματος, έχουν υψηλό κίνδυνο εμφάνισης της νόσου. Πολλοί άνθρωποι αναπτύσσουν την συγκεκριμένη παθολογική κατάσταση λόγω χορήγησης συνθετικών γλυκοκορτικοειδών-όπως το prednisone για το άσθμα, την ρευματοειδής αρθρίτιδα, τον λύκο κα. Επίσης, χορηγούνται και στην καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος σε μεταμοσχεύσεις οργάνων για αποφυγή απόρριψης του μοσχεύματος. Το 70%, όμως, των ατόμων που πάσχουν είναι λόγω υπερλειτουργίας της φλοιώδους μοίρας των επινεφριδίων. Οφείλεται, κυρίως, σε υπερέκκριση της κορτικοτροπίνης (ACTH) από αδενώματα (νεοπλάσματα) του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης. Η θεραπεία εξαρτάται από την εύρεση της εξειδικευμένης αιτίας της παρουσίας της υπερβολικής κορτιζόλης στον οργανισμό.

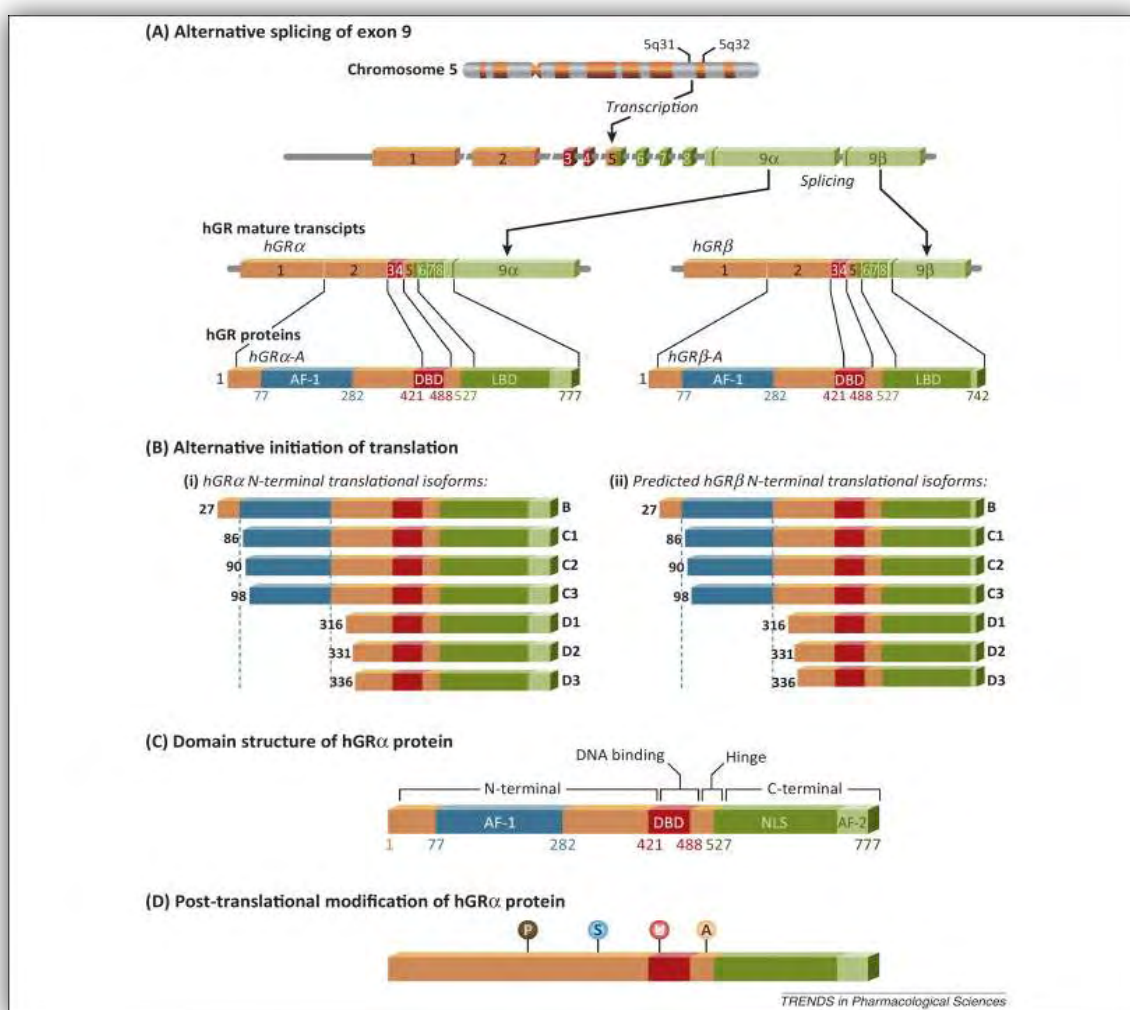
Η υπολειτουργία της φλοιώδους μοίρας των επινεφριδίων μπορεί να είναι πρωτογενής και δευτερογενής. Η ασθένεια του Addison (πρωτογενής) συμβαίνει όταν τα επινεφρίδια δεν μπορούν να παράγουν επαρκή ποσότητα κορτιζόλης. Ένα ποσοστό 80%, κυρίως γυναίκες μέσης ηλικίας, εμφανίζουν το σύνδρομο εξαιτίας ενός αυτοάνοσου νοσήματος, το οποίο επιτίθεται και καταστρέφει σταδιακά την φλοιώδη μοίρα των επινεφριδίων. Αντιμετωπίζεται με χορήγηση κορτικοστεροειδών για την εξισορρόπηση των επιπέδων της κορτιζόλης (Labeur M. et al, 2004). Και τα φυσικά αλλά και τα συνθετικά γλυκοκορτικοειδή μεταδίδουν τις επιδράσεις τους μόνο μέσω σύνδεσής τους με τον κυτταροπλασματικό υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (**GR**).

## 1.3 Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών GR

### 1.3.1 Δομή

Ο GR είναι ένας προσδετο-εξαρτώμενος μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος συγκαταλέγεται στην υπερικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων. Το ανθρώπινο *NR3C1* (nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1) γονίδιο, εντοπισμένο στο χρωμόσωμα 5q31-32, περιέχει 9 εξώνια με την κωδικεύουσα περιοχή να σχηματίζεται από τα εξώνια 2-9. Το εξώνιο 1 σχηματίζει την 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή, ενώ το εξώνιο 2 κωδικεύει το αμινοτελικό άκρο του υποδοχέα. Τα δύο δάκτυλα ψευδαργύρου (zinc fingers), υπεύθυνα για την σύνδεση με το DNA κωδικοποιούνται από δύο διαφορετικά εξώνια και πέντε εξώνια συνδυάζονται ώστε να δημιουργηθεί η περιοχή πρόσδεσης της κορτιζόλης. Μέσω εναλλακτικού ματίσματος, δημιουργούνται δύο ισομορφές του hGR: hGRα και hGRβ, οι οποίες είναι ομόλογες στην αμινοξική τους αλληλουχία μέχρι το κατάλοιπο 727 και μετά αποκλίνουν, με την hGRα να περιέχει επιπρόσθετα 50 αμινοξέα και την hGRβ να περιέχει 15 μη ομόλογα αμινοξέα (Kadmiel M., Cidlowski J., 2013, Encio I., Waldeighs S., 1990, Orsater H.

et al, 2012). Η hGRα ισομορφή συνδέεται με τα γλυκοκορτικοειδή, μεταφέρεται στον πυρήνα και στρατολογεί συνρρυθμιστές για την επίτευξη των μεταγραφικών επιδράσεων. Αντίθετα, η hGRβ ισομορφή εδρεύει ιδιοσυστατικά στον πυρήνα και δρα σαν αναστολέας της hGRα. Η τελευταία με την εναλλακτική έναρξη της μετάφρασης στο εξώνιο 2, παράγει οχτώ ακόμα ισομορφές του GR με μικρότερο N-τελικό άκρο (GRα-A, GRα-B, GRα-C1, GRα-C2, GRα-C3, GRα-D1, GRα-D2 και GRα-D3), προϊόντα εναλλακτικού σημείου έναρξης της μετάφρασης. Όλες αυτές οι ισομορφές έχουν παρόμοια συγγένεια και αλληλεπίδραση με τα γλυκοκορτικοειδή και τα GREs. Η εκτενής κατανομή όλων των ισομορφών του GR στους ιστούς επιτρέπει την σωστά ελεγχόμενη σηματοδότηση μέσω του GR, βασιζόμενη στην σχετική διαθεσιμότητά τους σε ένα δεδομένο κύτταρο ή ιστό (Kadmiel M., Cidlowski J., 2013). Η εύρεση της περιοχής εκκίνησης της μεταγραφής έγινε με την δοκιμή προστασίας από την νουκλεάση S1, η οποία απέδειξε ότι το σημείο εκκίνησης της μεταγραφής εντοπίζεται στο \*C κατάλοιπο της αλληλουχίας TAC\*CCTC, ενώ πολυάριθμα GC boxes και όχι TATA ή CAAT στοιχεία βρέθηκαν στην 5' περιοχή (Encio I, Wasleigh S., 1990).



**Εικόνα 7. Γονιδιακή θέση και οργάνωση του ανθρώπινου γλυκοκορτικοειδή υποδοχέα (GR).** Ο ανθρώπινος GR βρίσκεται στο χρωμόσωμα 5q31-32. (Α) Ο GR υφίσταται εναλλακτικές διαδικασίες για να λάβει πολλές λειτουργικές ισομορφές. Ο GR περιέχει 9 εξώνια: τα εξώνια 2-9 αποτελούν την κωδικεύουσα περιοχή που θα δώσει την πρωτεΐνη και το εξώνιο 1 σχηματίζει την 5'-αμετάφραστη περιοχή. Ο GR υφίσταται εναλλακτικό μάτισμα και δίνει γένεση στις hGRα και hGRβ ισομορφές, οι οποίες διαφέρουν στο C τελικό άκρο. (Β) Η GR ισομορφή, μέσω εναλλακτικής έναρξης της μετάφρασης, δίνει 8 επιπλέον ισομορφές με κουτσουρεμένο N άκρο (GRα-A, GRα-B, GRα-C1, GRα-C2, GRα-C3, GRα-D1, GRα-D2, and GRα-D3). Ο GRβ επίσης δίνει 8 β ισομορφές. (C) Ο GR περιέχει μία NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή trans-ενεργοποίησης, DBD, LBD και μία hinge region που διαχωρίζει την DBD και LBD. Η N τελική περιέχει την λειτουργία ενεργοποίησης της μεταγραφής (AF1), η οποία επιτρέπει την στρατολόγηση συνρρυθμιστών και της μεταγραφικής μηχανής. Τα γλυκοκορτικοειδή προσδένονται στην LBD, η οποία περιέχει και αυτή μία λειτουργία ενεργοποίησης της μεταγραφής (AF2). Η DBD/hinge region και η LBD περιέχουν σήματα εντοπισμού του πυρήνα, τα οποία μετατοπίζουν τον υποδοχέα στον πυρήνα. (D) Ο GR υφίσταται ποικίλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις συμπεριλαμβανομένου της φωσφορυλίωσης (P), σουμυλίωσης (SUMOylation) (S), ουβικουτίνωσης (U) και ακετυλίωσης (A) (Kadmiel M., Cidlowski J., 2013).

### 1.3.2 Το κυτταροπλασματικό σύμπλοκο του άπο-υποδοχέα

Απουσία γλυκοκορτικοειδών, ο GR εδρεύει στο κυτταρόπλασμα ως ανενεργό σύμπλοκο, σύμπλοκο του *άπο-υποδοχέα*. Αυτό το ολιγομερές σύμπλοκο αποτελείται από τον υποδοχέα, την Hsp90, Hsp70, p60, p23 και FKBP51. Οι πρωτεΐνες hsp90, p60 και hsp70 σχηματίζουν αυθόρμητα ένα σύμπλοκο και μετατρέπουν την LBD του GR δεκτική για πρόσδεση της ορμόνης με έναν ATP-εξαρτώμενο και K<sup>+</sup>-εξαρτώμενο τρόπο. Παρόλο που το παραπάνω σύμπλοκο πρωτεϊνών είναι επαρκές για την αλλαγή της διαμόρφωσης της LBD του υποδοχέα, το σύμπλοκο GR-hsp90 γρήγορα αποσυγκροτείται εάν δεν είναι παρούσα η p23 για να το σταθεροποιήσει (Dittmar K. et al, 1998). Αλληλεπίδραση του υποδοχέα με τις υπομονάδες των hsp90 είναι απαραίτητη για δημιουργία του σήματος και μετανάστευσης του ενεργοποιημένου GR στον πυρήνα, καθώς και για τη διατήρηση της στερεοδιάταξης του C-τελικού άκρου της περιοχής που συνδέεται με την ορμόνη. Επιπρόσθετα, οι hsp90s καθώς και άλλες πρωτεΐνες που σχετίζονται με τον υποδοχέα, είναι σημαντικές στην διεξαγωγή σωστής ωρίμανσης των νεοσυντιθέμενων υποδοχέων (Cosío B. et al, 2005). Έχουν ταυτοποιηθεί και άλλα μόρια-πρωτεΐνες που συμμετέχουν στον σχηματισμού του ετεροσυμπλόκου, όπως δύο μέλη της οικογένειας των ανοσοφιλών, η FKBP51 και η FKBP52. Τα γλυκοκορτικοειδή εισέρχονται στο κυτταρόπλασμα με παθητική διάχυση μέσω της κυτταρικής μεμβράνης. Στο κυτταρόπλασμα, δεσμεύονται στο σύμπλοκο του GR, το οποίο υφίσταται αλλαγές στην διαμόρφωσή του. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αποσύνδεση των hsp90s και των υπόλοιπων μορίων, τον ομοδιμερισμό του με έναν άλλον ενεργοποιημένο GR και την μεταφορά του στον πυρήνα μέσω των πυρηνικών πόρων.

### 1.3.3 Μετατόπιση του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα

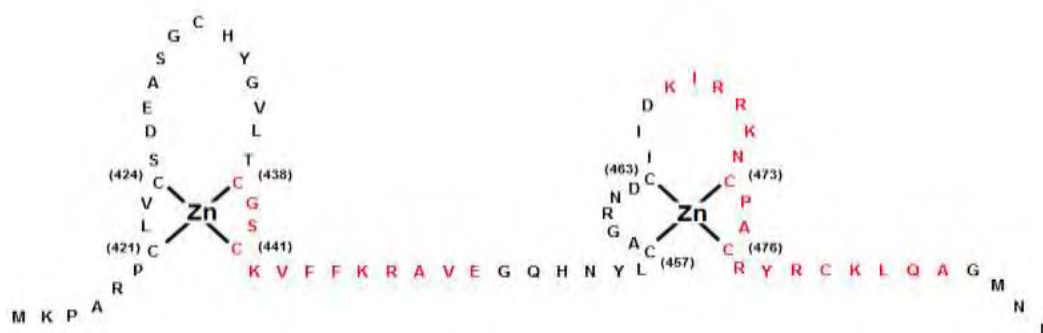
Οι Picard και Yamamoto έχουν περιγράψει δύο ξεχωριστά σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLSs) του GR: NLS και NLS2. Το NLS1 αποτελείται από 28 αμινοξέα και βρίσκεται στα σύνορα των περιοχών DBD- αρμού (hinge), ενώ το NLS2 βρίσκεται στην LBD. Έχει παρατηρηθεί ότι το NLS1 μεσολαβεί ραγδαία μετατόπιση του υποδοχέα στον πυρήνα ( $t_{1/2} = 4-6$  min), ενώ η πυρηνική εισαγωγή από το NLS2 είναι αρκετά πιο αργή ( $t_{1/2} = 45-60$  min) και είναι ανίκανη να πραγματοποιήσει μετατόπιση ολόκληρου του υποδοχέα. Τα NLSs αναγνωρίζονται από τις ιμφορτίνες (importins). Αυτές οι μεγάλες πρωτεΐνες (90–130 kDa) περιέχουν μία N-τελική RanGTP-binding domain και μία C-terminal cargo-binding domain. Ο γενικός μηχανισμός είναι: οι ιμφορτίνες δεσμεύονται στο NLS των πρωτεϊνών-φορτίων τους και μετατοπίζονται στον πυρήνα, όπου το σύμπλοκο ιμφορτίνη-φορτίο διαχωρίζεται μέσω της σύνδεσης της ιμφορτίνης στο RanGTP. Το φορτίο απελευθερώνεται στον πυρήνα και το σύστημα της ιμφορτίνης ανακυκλώνεται στο κυτταρόπλασμα (Vandevyver S. et al, 2012).

### 1.3.4 Διμερισμός του GR και πρόσδεσή του υποδοχέα σε αλληλουχίες του DNA

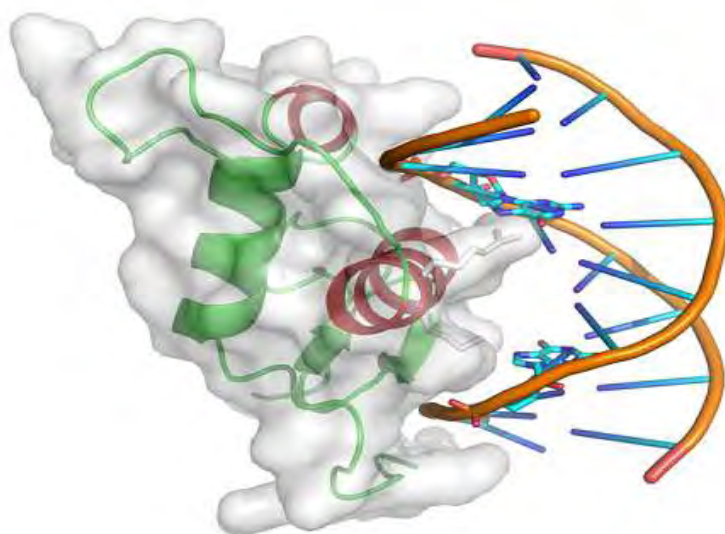
Υπάρχουν αποδείξεις ότι ο ολιγομερισμός του GR είναι ανεξάρτητος από την σύνδεσή στο DNA σε κύτταρα θηλαστικών και ζύμης, καθώς αυτός επιτυγχάνεται μέσω μιας αλληλεπίδρασης της περιοχής αρμού (hinge) των υποδοχέων. Η ελάχιστη περιοχή που είναι απαραίτητη για τον διμερισμό του GR, είναι από το αμινοξύ 505 μέχρι το 524, η οποία παίζει κεντρικό ρόλο αλλά δεν συντελείται όλη η διαδικασία μόνο με αυτή την αλληλεπίδραση. Μελέτες *in vivo* έχουν δείξει ότι οι αλληλεπιδρώσες περιοχές του GR, περιέχουν και τμήματα των LBD ή DBD επιπρόσθετα με την ελάχιστη περιοχή (SAVORY J. et al, 2000).

Με την προσδετο-εξαρτώμενη ενεργοποίηση, ο GR δρα σαν ένας ειδικός μεταγραφικός παράγοντας που προσδέεται σε ένα ομόλογο DNA μοτίβο, το στοιχείο απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (GRE), για να καθοδηγήσει την έκφραση γονιδίων (Biddie S. et al, 2011). Πολλά γονίδια που ανταποκρίνονται στα στεροειδή περιέχουν GREs στην περιοχή των προαγωγέων τους. Η αλληλουχία των GREs είναι μία τυπική παλίνδρομη επανάληψη δύο εξαμερών αλληλουχιών, οι οποίες χωρίζονται από ένα κενό 3bp (Meijsing S. et al, 2009). Η αλληλεπίδραση του GR με τα GREs μπορεί να επάγει μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων ή μεταγραφική καταστολή. Η 15bp αλληλουχία των (+)GREs είναι η GGTACAnnnTGTTCT ενώ των negativeGREs (-) είναι η CTCC(n)<sub>0-2</sub>GGAGA (Hudson W. et al, 2013). Τα δύο μονομερή του GR αλληλεπιδρούν με το κάθε μισό του παλίνδρομου GRE. Στην DBD του υποδοχέα, υπάρχουν δύο Zn<sub>2</sub>Cys<sub>4</sub>- μοτίβα, τα οποία απέχουν μεταξύ τους 60-70 κατάλοιπα, και μία -COOH τελική προέκταση. Τα αμινοξέα που είναι απαραίτητα για την αναγνώριση των στοιχείων του DNA, βρίσκονται στην βάση του πρώτου δάκτυλου,

σε μία περιοχή που ονομάζεται P box. Άλλα αμινοξέα του δεύτερου δάχτυλου Zn σχηματίζουν το D box που συμμετέχει στον διμερισμό. Ο πυρήνας της DBD περιέχει δύο α-έλικες: η πρώτη είναι η έλικα αναγνώρισης, που συνδέεται στην μεγάλη αύλακα του DNA, ενώ η δεύτερη σχηματίζει την σωστή γωνία με την πρώτη α-έλικα επιτρέποντας την σωστή σύνδεση στο DNA (Krauss G., 2003).



**Εικόνα 8. Δομή του GR DBD και οι αλληλεπιδράσεις του με GRE DNA.** Δομές δάχτυλα ψευδαργύρου στην DBD του hGR. Οκτώ αριθμημένα κατάλοιπα κυστεΐνης χηλικωποιημένα με  $Zn^{2+}$  για το σχηματισμό δύο ξεχωριστών δομών δαχτύλου. Τα κόκκινα αμινοξικά κατάλοιπα σχηματίζουν δομές α-ελίκων.



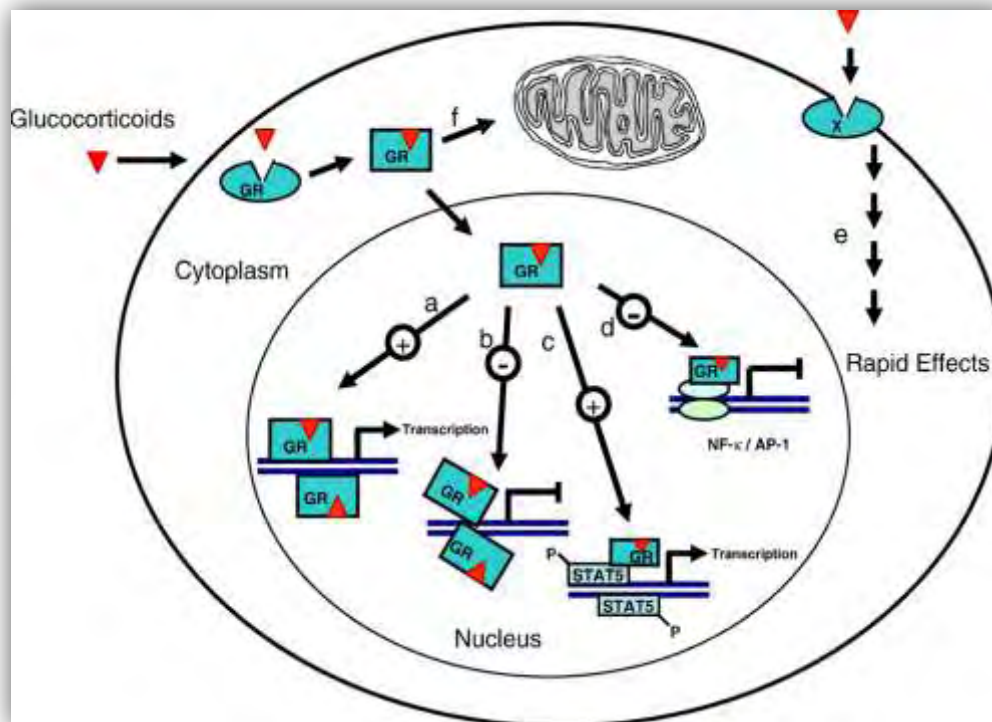
**Εικόνα 9. 3D μοντέλο της φυσικής αλληλεπίδρασης μεταξύ του GR DBD και GRE DNA.** Το N άκρο της πρώτης α έλικας του GR DBD βρίσκεται στη μεγάλη αύλακα του δίκλωνου DNA, ενώ το C άκρο στην και των δύο μοτίβων βρίσκεται πάνω από την μικρή αύλακα. The images was created and kindly donated by Dr. D.E. Hurt (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH, Bethesda, MD).

Η έκταση της ρύθμισης της μεταγραφής από τα γονίδια που ανταποκρίνονται στα στεροειδή εξαρτάται από τον αριθμό των GREs, την συγγένεια του γλυκοκορτικοειδούς-GR σύμπλοκο με το GRE και με την θέση που βρίσκεται το GRE σε σχέση με το σημείο εκκίνησης της μεταγραφής. Σύνδεση του συμπλόκου με το GRE επιφέρει αλλαγές στην διαμόρφωση του DNA και έκθεση κρυμμένων περιοχών έτσι ώστε αυξάνεται η στρατολόγηση άλλων μεταγραφικών παραγόντων (Van der Velden V. H. J., 1998)

Η ρύθμιση της μεταγραφής από τον GR είναι μία περίπλοκη διαδικασία, η οποία μπορεί να συνοψισθεί στους παρακάτω μηχανισμούς:

- 1) Η αλληλεπίδραση GR-GRE οδηγεί στην επαγωγή (συνήθως) ή στην καταστολή γονιδίων ανταποκρινόμενα σε στεροειδή, με τη στρατολόγηση συνενεργοποιητών- συνκαταστολέων και συμπλόκων ανακατασκευής της δομής της χρωματίνης.
- 2) Οι GR (πυρηνικοί υποδοχείς) μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση γονιδίων που δεν περιέχουν GREs, παρεμβαίνοντας θετικά ή αρνητικά στην δράση μεταγραφικών παραγόντων άλλων μονοπατιών σηματοδότησης (crosstalk). Οι αλληλεπιδράσεις αυτές έχουν σαν αποτέλεσμα την αλλαγή της υπερελίκωσης του DNA.
- 3) Μη-γονιδιωματικές (non-genomic) επιδράσεις, όπου δεν συμμετέχει η πυρηνική δράση του GR.





**Εικόνα 10. Μηχανισμοί δράσης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών.** Τα γλυκοκορτικοειδή μέσω της πρόσδεσης τους στους υποδοχείς και της αλληλεπίδρασης τους με τα στοιχεία απόκρισης στις ορμόνες, Hormone Response Elements (HREs), μπορούν είτε να α) ενεργοποιήσουν είτε β) να αναστείλουν τη μεταγραφή. Επίσης, μέσω της αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης του συμπλόκου ορμόνης υποδοχέα με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες η ορμόνη μπορεί είτε γ) να ενεργοποιήσει είτε δ) να μπλοκάρει τη μεταγραφή. Η ορμόνη επίσης μπορεί να οδηγήσει σε γρήγορες, μη γονιδιωματικές, επιδράσεις (ε) μέσω της κλασικής οδού των μεμβρανικών υποδοχέων, των G-πρωτεϊνών ή ακόμα και σε απροσδιόριστα για την ώρα μόρια και μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Στα μιτοχόνδρια (f), το σύμπλοκο ορμόνης υποδοχέα σε αλληλεπίδραση με το μιτοχονδριακό γονιδίωμα, μπορεί να ρυθμίσει τη μιτοχονδριακή μεταγραφή. (Psarra et al.,2008).

### 1.3.5 ΘΕΤΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ

Το βασικό δομικό στοιχείο της χρωματίνης είναι το νουκλεόσωμα, το οποίο αποτελείται από 146bp DNA τυλιγμένο γύρω από δύο μόρια τετραμερών ιστονών-H2A, H2B, H3 και H4. Το οκταμερές των ιστονών καθώς και η ιστόνη H1, που συνδέει τα διαδοχικά οκταμερή μεταξύ τους, επιτρέπουν στο DNA να συμπτυχτεί στην δομή του νουκλεοσώματος. Παρόλο που αυτή η δομή βοηθά στο πακετάρισμα του DNA, η χρωματίνη εμποδίζει τη μεταγραφή του. Το DNA πακεταρισμένο ως χρωματίνη, εμφανίζει αντίσταση στην δοκιμασία με νουκλεάση αλλά εμποδίζει την σύνδεση μεταγραφικών παραγόντων στις αλληλουχίες αναγνώρισής τους. Μοριακά γεγονότα που αλλάζουν τοπικά την δομή της χρωματίνης σχετίζονται με αυξημένη ευαισθησία στην νουκλεάση και ελεύθερη πρόσβαση των μεταγραφικών παραγόντων

στις συγγενείς τους θέσεις. Υπάρχουν λίγα μοντέλα για την ανάλυση της επιρροής στην ενεργοποίηση γονιδίων από την δομή της χρωματίνης. Ένα εκτενέστερα μελετημένο μοντέλο για την ενεργοποίηση της χρωματίνης από τον GR είναι ο υποκινητής Mouse Mammary Tumor Virus promoter (MMTV) (Bonnie J Deroo B. J. Kai Archer T. K., 2001) Ένα τμήμα του υποκινητή (Nuc-B) περιέχει HRE και επιτρέπει την άμεση ενεργοποίηση του υποκινητή από τα γλυκοκορτικοειδή. Η εφαρμογή γλυκοκορτικοειδών οδηγεί το Nuc-B τμήμα σε υπερευαισθησία σε ενδονουκλεάση. Αυτή η αντίδραση είναι χαρακτηριστική σε περιοχές ενεργής χρωματίνης, όπου και είναι θέσεις δέσμευσης μεταγραφικών παραγόντων. Έτσι, δημιουργείται ένα προ-εναρκτήριο σύμπλοκο, από το οποίο έπεται η έναρξη της μεταγραφής. Μολαταύτα, έχειδειχτεί επίσης ότι οι εναρκτήριοι μεταγραφικοί παράγοντες είναι μονίμως προσδεδεμένοι στον υποκινητή και δεν χρειάζονται τον GR για την σύνδεσή τους. Οι μελέτες αυτές στο σύνολο τους, υποστηρίζουν ότι ο GR έχει δύο τρόπους ενεργοποίησης της μεταγραφής: α) ο ενεργοποιημένος GR επάγει την αναδιάταξη της χρωματίνης και β) επάγει μεταγενέστερα την στρατολόγηση μεταγραφικών παραγόντων στις θέσεις σύνδεσής τους. Η χρωματίνη ανοίγει και η RNA polymerase 2 είναι ελεύθερη να ξεκινήσει την μεταγραφή. Κρίσιμο ρόλο στην σηματοδότηση του GR παίζουν τα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης. Στον άνθρωπο έχουν απομονωθεί δύο, τα BRG1 και BRM, τα οποία αποτελούνται από πολλές υπομονάδες και τους είναι απαραίτητο το ATP για να δράσουν. Στην περίπτωση MMTV-GR υποδοχέα, ο GR απαιτεί την παρουσία του BRG1 για την αλλαγή και ενεργοποίηση του υποκινητή. Ο υποδοχέας στοχεύει το BRG1 στον υποκινητή μέσω αλληλεπίδρασής του με την υπομονάδα BAF250 του συμπλόκου (αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης). Τελικά, μελέτες αποδεικνύουν ότι ο GR σχετίζεται με τον υποκινητή παροδικά και είναι απαραίτητος για να δώσει το εναρκτήριο έναυσμα στα γεγονότα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης (Bonnie J Deroo B. J. Kai Archer T. K., 2001). Ο GR προσδένεται σε ποικίλους συν-ενεργοποιητές της μεταγραφής, όπως οι p300/CBP, SRC1, TIF-2/GRIP-1, και ACTR/pCIP. Κάποιοι από αυτούς, p300/CBP και SRC-1, έχουν δράση ακετυλοτρανσφεράσης της ιστόνης. Και οι δύο αυτοί μεταγραφικοί παράγοντες έχειδειχτεί ότι αλληλεπιδρούν με τον GR ιδιοσυστατικά, ακετυλιώνουν τις βασικές ιστόνες του νουκλεοσώματος, στις λυσίνες του N-τελικού άκρου τους, ρυθμίζοντας τη μεταγραφή των γονιδίων.

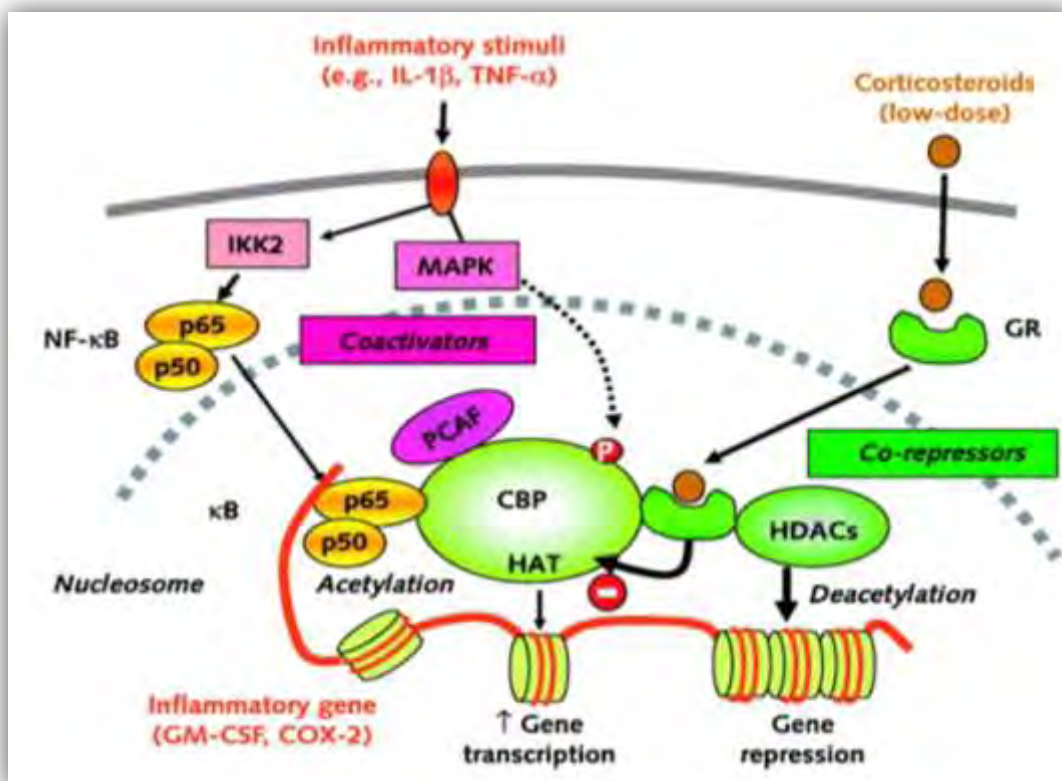
### 1.3.6 ΑΡΝΗΤΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ

Εκτός από την επαγωγή της έκφρασης γονιδίων, ο GR μπορεί να την αναστείλει είτε μέσω της συνομιλίας με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, χωρίς τη σύνδεση του GR στο DNA, είτε μέσω των nGRs. Όσον αφορά την πρώτη περίπτωση, μία εκτενέστερα μελετημένη περίπτωση είναι αυτή της αλληλεπίδρασής του με τους φλεγμονώδης παράγοντες AP-1 και NF-κB. Η σημαντική επίδραση στην φυσιολογία του ατόμου της κατασταλτικής δράσης του ομοδιμερή-GR, ανεξάρτητη από την σύνδεσή του με το DNA, έχει παρατηρηθεί από πειράματα με μεταλλαγμένα ομόζυγα ποντίκια ως προς την απώλεια της ικανότητας σύνδεσης στο DNA του GR (GR<sup>dim</sup>).



Σε αυτά τα ποντίκια, η σύνδεση στο DNA και κατά συνέπεια η μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων που περιείχαν GREs και nGREs είχε εξασθενήσει, ενώ η καταστολή γονιδίων του μονοπατιού που συμπεριλάμβανε των AP-1 σε εμβρυονικούς ινοβλάστες ήταν φυσιολογική. Σε αντίθεση με τα ποντίκια που είχαν ανεπάρκεια του GR, τα GR<sup>dim</sup> έζησαν μέχρι την ενηλικίωση, αποδεικνύοντας την έκταση της σημαντικότητας της αλληλεπίδρασης του GR με άλλους παράγοντες στην φυσιολογική ανάπτυξη και λειτουργία του οργανισμού (Reichardt H.M et al, 1998). Ο μεταγραφικός παράγοντας AP-1 είναι ένα διμερές από δύο πρωτο-ογκογονίδια μέλη της οικογένειας c-Jun και c-Fos και συμμετέχει στην ρύθμιση πολλών γονιδίων, όπως κυτοκινών και μορίων προσκόλλησης. Κάποια από τα γονίδια που ελέγχει ο AP-1 είναι αυτά της ενδιάμεσης κολαγενάσης (MMP-13) και stromelysin-1(MMP-3), τα οποία παρατηρούνται σε υψηλά ποσοστά σε όγκους του δέρματος. Ο GR ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, ενεργοποιεί ή καταστέλλει την έκφραση του c-Jun. Μετά από χορήγηση DEX σε GR<sup>dim</sup> ποντίκια, παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων έκφρασης των MMP-13 και MMP-3 αλλά σταθερή έκφραση του c-Jun/c-Fos γεγονός που αποδεικνύει ότι αναστέλλεται η δράση του AP-1 από τον GR και όχι από την απώλεια των βασικών υπομονάδων c-Jun/c-Fos (Tuckermann P. et al, 1999).

Όπως και ο AP-1, ο NF-κB είναι ένα ετεροδιμερές από δύο υπομονάδες του p50 και p65 και ελέγχει την έκφραση πολλών γονιδίων όπως και αυτών των φλεγμονωδών. Σε μη ερεθισμένα κύτταρα, ο NF-κB εδρεύει στο κυτταρόπλασμα μέσω αλληλεπίδρασης με τους αναστολείς IκBa και IκBβ. Όταν το κύτταρο ενεργοποιηθεί από παράγοντες όπως η IL-1β ή ο TNFα, ο IκBβ φωσφορυλιώνεται, ουβικουιτινώνεται και πρωτεολύεται. Ο ελεύθερος διμερής NF-κB μεταφέρεται στον πυρήνα κατευθείαν στα γονίδια στόχους του και αλληλεπιδρά με συνεργοποιητές, όπως οι p300/CREB (cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein)-binding protein (CBP) και p300/CBP-associated factor (PCAF), οι οποίοι έχουν ενσωματωμένη δράση ακετυλοτρανσφεράσης HAT και ακετυλιώνουν τις ιστόνες. Τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν να αναστείλουν τα συγκεκριμένα γονίδια μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης του GR με την υπομονάδα p65 του NF-κB (Van der Velden V. H. J., 1998). Αυτή η άμεση επαφή οδηγεί στην αμοιβαία καταστολή των δράσεων και των δύο μεταγραφικών παραγόντων. Πιο συγκεκριμένα, ο GR θα αναστείλλει τη μεταγραφή των γονιδίων που εξαρτώνται από την p65 και η υπερέκφραση της p65 θα ισότιμα εμποδίζει την ενεργοποίηση γονιδίων από τον GR.



**Εικόνα 11. Η καταστολή της έκφρασης φλεγμονωδών γονιδίων από τα κορτικοστεροειδή.** Η έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την φλεγμονή ενεργοποιείται από παράγοντες, όπως η ιντερλευκίνη 1β (IL-1β) και ο TNF-α, οι οποίοι ενεργοποιούν τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κB (p56/p50), ο οποίος στην συνέχεια αλληλεπιδρά με άλλους παράγοντες που έχουν δράση ακετυλοτρανσφεράσης ιστονών (HAT) και τους ενεργοποιούν. Τα κορτικοστεροειδή χορηγούμενα σε χαμηλή δόση αναστέλλουν τις HATs ή ενεργοποιούν τις HDACs, αναστέλλοντας και στις δύο περιπτώσεις την έκφραση φλεγμονωδών γονιδίων. Από P. J. Barnes, I. M. Adcock, How do corticosteroids work in asthma, *Ann Intern Med.* 2003, 139, 359-370.

Ο GR μπορεί να καταστείλει τη μεταγραφή και με τη σύνδεσή του σε ειδικές, πολύ διαδεδομένες παλίνδρομες αλληλουχίες με κενό μεταξύ τους από 0-2 hr, τα λεγόμενα nGREs σε γονίδια στόχους. Με τη σύνδεση του GR, τα nGREs στρατολογούν συνκαταστολείς (NCoR και SMRT), οι οποίοι με την σειρά τους καλούν απακετυλάσες των ιστονών (HDACs) για να ασκήσουν την γονιδιακή καταστολή. Επίσης, έχει ανακαλυφθεί ότι με τη σύνδεση του GR στα nGREs, αποτρέπεται ο διμερισμός του υποδοχέα, κάτι που είναι εντελώς αντίστροφο με την σύνδεση του GR στα GREs. Έτσι, το DNA με τη μορφή των GREs, δεν δρα μόνο ως ένα σημείο αγκυροβόλησης του GR αλλά μπορεί να ρυθμίσει μέσω αλλοστερικής τροποποίησης τη δομή και τη μεταγραφική του ικανότητα (Hudson W. et al, 2013).

### 1.3.7 Μη γονιδιωματικές δράσεις του GR

Τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν να δράσουν μέσω του GR ακολουθώντας μη γονιδιωματικό μονοπάτι, γεγονός που εξηγεί ως ένα βαθμό την γρήγορη ανοσοκατασταλτική και αντιφλεγμονώδη δράση τους. Ο ενεργοποιημένος κυτταροπλασματικός ή προσδεδεμένος στην μεμβράνη υποδοχέας μπορεί να αλληλεπιδράσει με ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες, οδηγώντας σε αναστολή φλεγμονωδών μεσολαβητών όπως το αραχιδονικό οξύ. Το αραχιδονικό οξύ παράγεται από την δράση της φωσφολιπάσης A2 στα φωσφολιπίδια της μεμβράνης. Ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF), προσδένεται στους μεμβρανικούς υποδοχείς του και ενεργοποιεί την φωσφολιπάση που έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή του αραχιδονικού. Το αραχιδονικό οξύ είναι η πρόδρομη ουσία της προσταγλανδίνης D2 και πολλών λευκοτριενίων, μόρια που επάγουν την βρογχοσυστολή, την υπερέκκριση βλέννας και το οίδημα στους βρόγχους. Όταν ενεργοποιηθεί ο GR, κάποια συστατικά του πρωτεϊνικού συμπλόκου του διαχωρίζονται, πχ src, και μπλοκάρουν την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης 2 από τον EGF και άρα την παραγωγή του αραχιδονικού οξέος. Τέλος, ο GR μπορεί να αλληλεπιδράσει με μεμβράνες, κυρίως βιολογικές και μιτοχονδριακές (Alangari A. A., 2010).

### 1.3.8 Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις

Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις είναι πολύ σημαντικές στην ρύθμιση της πρωτεϊνικής λειτουργίας των ευκαρυωτικών κυττάρων. Ο GR, όπως και άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες, είναι μία φωσφοπρωτεΐνη που μπορεί να φωσφορυλιωθεί σε πολλά σημεία αλλάζοντας τη λειτουργία του. Ανάλογα με την κινάση, η ενεργότητα του GR μπορεί να ενισχυθεί ή να μειωθεί. Για παράδειγμα, φωσφορυλίωση του GR από κινάσες εξαρτώμενες από κυκλίνη (Cdk1, Cdk2 και Cdk5) έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ενεργότητας του υποδοχέα, ενώ οι JNK και GSK3 τον αναστέλλουν. Από την άλλη πλευρά, η φωσφορυλίωση από κινάσες όπως η p38MAPK, επηρεάζουν θετικά και αρνητικά τον GR ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο. Η φωσφορυλίωση του GR είναι κυρίως εξαρτημένη από το πρόσδεμα (ligand-dependent) αλλά και ανεξάρτητη σε μικρότερο όμως βαθμό. Τρία κύρια σημεία της δράσης του GR επηρεάζονται από την φωσφορυλίωση: 1) Η συγγένεια με το DNA, 2) η αλληλεπίδραση των περιοχών trans-ενεργοποίησης με το εναρκτήριο σύμπλοκο της μεταγραφής και 3) η κυκλοφορία του GR μεταξύ των κυτταροπλασματικών διαμερισμάτων. Στον ανθρώπινο GR, πολλά κατάλοιπα σερίνης έχουν βρεθεί ότι μπορούν να φωσφορυλιωθούν (S113, S134, S141, S143, S203, S211, S226 και S404) και μάλιστα τα περισσότερα συγκατάλεγονται στο N-τελικό άκρο, που περιέχει και την περιοχή AF-1. (Ismaili N, Garabedian MJ., 2004, (Kumar R., Calhoun W. J., 2008).

Μία ακόμη μετα-μεταφραστική τροποποίηση που μπορεί να υποστεί ο GR είναι η ακετυλίωση. Σε αντίδραση των γλυκοκορτικοειδών, η λυσίνες 494 και 495 ακετυλιώνονται, αλλαγή που έχει ζημιογόνο αντίκτυπο στην ικανότητα του GR να αναστείλει τον NF-κB.

## 1.4 ΤΟ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΟ

### 1.4.1 Γενικά

Τα μιτοχόνδρια είναι ημιαυτόνομα οργανίδια τα οποία συνυπάρχουν σε μία συμβιωτική σχέση με το κύτταρο. Περιέχουν το δικό τους γενετικό υλικό (DNA) αλλά είναι και εξαρτημένα από τις λειτουργίες του πυρήνα. Τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα ποικίλλουν ευρέως σε μέγεθος κατά μήκος της φυλογενετικής κλίμακας. Υποστηρίζεται ότι τα μιτοχόνδρια προήλθαν από α-μωβ βακτήρια. Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται από το γεγονός της ενδοσυμβίωσης, η οποία εξηγεί ότι υπήρχε ένας ελεύθερος οργανισμός ικανός να διεξαγάγει οξειδωτική φωσφορυλίωση, αυτός εγκολλώθηκε από κάποιο άλλο κύτταρο και πολλά από τα γονιδιά του μεταφέρθηκαν στα πυρηνικά χρωμοσώματα. Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται από την αυξημένη ομοιότητα του μιτοχονδριακού γονιδιώματος με αυτό των βακτηρίων, συγκεκριμένα του πρωτοζώου *Reclimonas americana* (Berg J. M. et al, Biochemistry, Fifth Edition). Πάντως, τα μιτοχόνδρια φέρουν ακόμα την σφραγίδα των προγόνων τους, χρησιμοποιώντας εκτός των άλλων ένα N-φορμυλμεθιονύλ-tRNA ως εναρκτήριο tRNA για την πρωτεϊνσύνθεση (Taanman J-W, 1998).

### 1.4.2 Η δομή των μιτοχονδρίων

Τα μιτοχόνδρια είναι ωοειδή οργανίδια, που έχουν συνήθως μήκος 7μm και διάμετρο 0,5-0,1μm. Το σχήμα και ο αριθμός τους ανά κύτταρο εξαρτάται από τον ιστό. Ιστοί με υψηλές απαιτήσεις σε ενέργεια, όπως οι σκελετικοί μύες και οι νεφροί έχουν μεγαλύτερο αριθμό μιτοχονδρίων απ ότι ιστοί με μικρότερες ενεργειακές απαιτήσεις (Krauss S., 2001). Μελέτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας των George Palade και Fritjof Sjostrand αποκάλυψαν ότι τα μιτοχόνδρια έχουν δύο συστήματα μεμβρανών: μία εξωτερική μεμβράνη και μία μεγάλων διαστάσεων πτυχωτή εσωτερική μεμβράνη. Οι πτυχώσεις της εσωτερικής μεμβράνης ονομάζονται ακρολοφίες. Έτσι, στο μιτοχόνδριο δημιουργούνται δύο διαμερίσματα: 1) ο διαμεμβρανικός χώρος μεταξύ της εσωτερικής και εξωτερικής μεμβράνης και 2) η μήτρα (matrix), η οποία περιβάλλεται από την εσωτερική μεμβράνη. Η εξωτερική και η εσωτερική μεμβράνη εμφανίζουν διαφορές ως προς τη σύσταση των φωσφολιπιδίων τους και ως προς την αναλογία πρωτεΐνης/λιπιδίων. Η εξωτερική μεμβράνη είναι διαπερατή από όλα τα μικρά μόρια και ιόντα διότι περιέχει πολλά μόρια μίας μιτοχονδριακής πορίνης, MB 30-35 kb, γνωστή ως VDAC (voltage-dependent anion channel). Αντίθετα, η εσωτερική μεμβράνη είναι λιγότερο διαπερατή από τα ιόντα και πολικά μόρια και η ανταλλαγή μεταξύ του κυτοσολίου και της μήτρας μορίων όπως ATP, πυροσταφυλικό οξύ και κιτρικό, πραγματοποιείται από πρωτεϊνικούς μεταφορείς. Έτσι, δημιουργείται διαμερισματοποίηση στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου και η μήτρα μπορεί να διαχωρίζεται από το κυτοσόλιο. Στην εσωτερική μεμβράνη εδρεύονται και τα 5 ενζυμικά σύμπλοκα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Τα μιτοχόνδρια έχουν το δικό τους γενετικό υλικό (mtDNA) το

οποίο βρίσκεται στην μήτρα σε πολλά αντίγραφα. Για πάνω από 3 δεκαετίες, έχει αναγνωρισθεί ότι στα θηλαστικά, το μιτοχονδριακό γονιδίωμα μεταφέρεται μόνο μέσω της θηλυκής γαμετικής σειράς (Berg J. M. et al, Biochemistry, Fifth Edition; Krauss S., 2001).

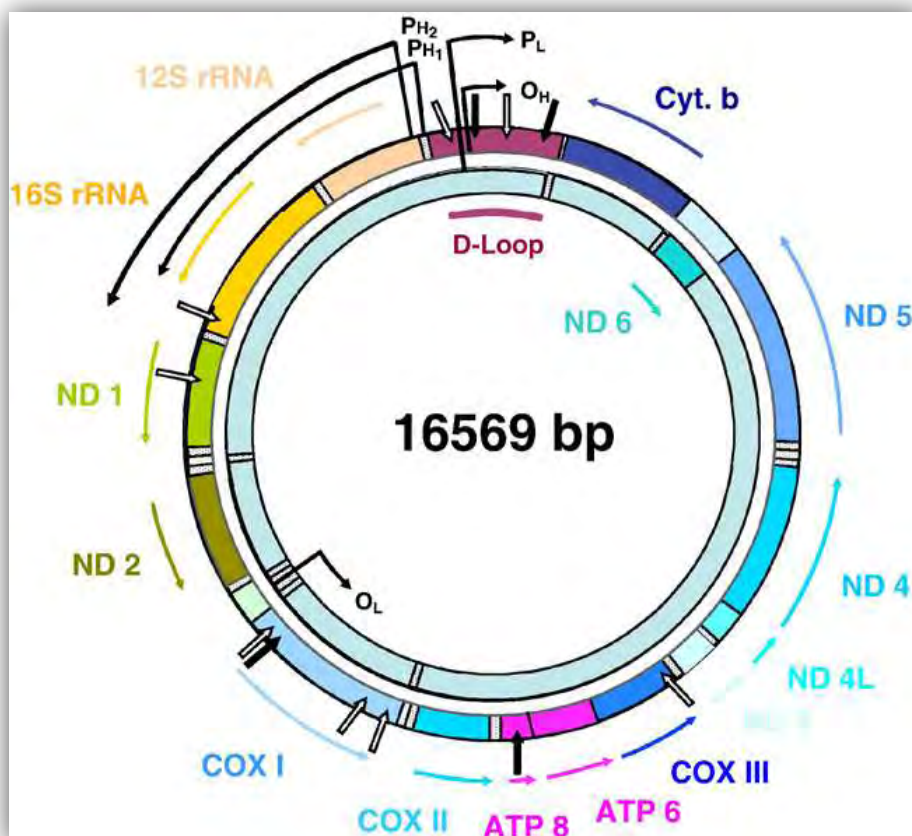
#### **1.4.3 Οι αντιδράσεις του μεταβολισμού που επιτελούνται στο μιτοχόνδριο**

Στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων επιτελούνται κύριες μεταβολικές αντιδράσεις όπως η β-οξειδωση λιπαρών οξέων, ο κύκλος του κιτρικού οξέος και οι αντιδράσεις της αναπνευστικής αλυσίδας, ενώ η γλυκόλυση, η βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων και το μεγαλύτερο μέρος του μεταβολισμού των αμινοξέων επιτελούνται στο διαλυτό κυτταρόπλασμα. Οι μεταβολίτες που χρησιμοποιούνται για τη β-οξειδωση, τον κύκλο του κιτρικού οξέος, αλλά και το υδρογόνο για την αναγωγή του NAD κατά τη γλυκόλυση, στην αναπνευστική αλυσίδα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, εισάγονται στο μιτοχόνδριο από το εξωτερικό περιβάλλον, ενώ αντίστροφα οι μεταβολίτες που παράγονται στα μιτοχόνδρια εξέρχονται για περαιτέρω επεξεργασία στο κυτταρόπλασμα.

Η εσωτερική επιφάνεια της εσωτερικής μεμβράνης φέρει τα οργανωμένα στοιχεία της αναπνευστικής αλυσίδας, την ηλεκτρική αφυδρογονάση και τους παράγοντες σύζευξης. Τα ένζυμα για την οξείδωση του πυροσταφυλικού οξέος, των λιπαρών οξέων αλλά και αυτά που συμμετέχουν στον κύκλο του κιτρικού οξέος (εκτός από την ηλεκτρική αφυδρογονάση) περιέχονται στη μήτρα του μιτοχονδρίου. Η μιτοχονδριακή μήτρα περιέχει και άλλα εκατοντάδες ένζυμα αλλά και πολλά αντίγραφα του γονιδιώματος του μιτοχονδριακού DNA, μιτοχονδριακά ριβοσώματα και tRNAs.

#### **1.4.4 Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα**

Η δομή και η οργάνωση του mtDNA εμφανίζουν υψηλή συντήρηση μεταξύ των θηλαστικών. Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα των θηλαστικών αποτελείται από ένα κυκλικό δίκλωνο μόριο DNA, περίπου 16,6 kb.



**Εικόνα 12. Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα των θηλαστικών και αλληλουχίες όμοιες με HREs για στεροειδείς και θυροειδείς ορμόνες.** Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα των θηλαστικών είναι ένα κυκλικό δίκλωνο μόριο σχεδόν 16Kb (ανθρώπινο: 16,569 βάσεις). Οι δύο κλώνοι του DNA έχουν μία ασύμμετρη κατανομή πουρινών και πυριμιδινών, δίνοντας την βαριά (H) αλυσίδα και την ελαφριά (L). Η L αλυσίδα μεταγράφεται από έναν κυρίαρχο προαγωγέα (PL), ενώ η H μεταγράφεται από δύο γειτονικούς προαγωγείς (PH1 και PH2), τοποθετημένοι στη ρυθμιστική περιοχή που περιέχει την θηλιά D (D loop). Η απουσία ενδογονιδιακού χώρου (intragenic space), μαρτυρά ότι η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης βρίσκεται στην D-loop, παρόλου που η παρουσία ενδογονιδιακών ρυθμιστικών αλληλουχιών θα μπορούσε να ρυθμίζει άλλα στάδια της μεταγραφικής διαδικασίας. Η μεταγραφή που πηγάζει από τους PH2 και PL δίνει μακριά, πολυκιστρονικά προϊόντα, κάποια από τα οποία είναι σχεδόν ίσα σε μήκος με το γονιδίωμα, και επεξεργάζονται μεταγενέστερα απελευθερώνοντας ώριμα mRNAs και tRNAs. Η μεταγραφή από τον PH1 παράγει ένα μικρό μήνυμα που περιέχει τα δύο rRNAs και τερματίζεται σε μία ειδική tRNA-Leu του γονιδίου. Ένας παράγοντας λήξης της μεταγραφής (mTERF) προωθεί τον τερματισμό της μεταγραφής που έχει ξεκινήσει από τον PH1. Τα mRNAs κωδικεύουν τρεις υπομονάδες της κυτοχρωμικής οξειδάσης (I, II and III, COX I, COX II, COX III), εφτά της NADH-CoQ-αναγωγάσης (ND 1–6 και ND4L), μία του κυτοχρώματος b (cyt-b), δύο της ATP-συνθάσης (ATP 6, 8), δύο ριβοσωμικά RNAs (12S and 16S rRNA) και 22 tRNAs. Μόνο η ND6 και τα Gln, Ala, Asn, Cys, Tyr, Ser, Glu and Pro-tRNAs προέρχονται από την μεταγραφή της ελαφριάς αλυσίδας. Έχουν χαρακτηριστεί τρεις μεταγραφικοί παράγοντες, mTFA, mTFB1 και

mTFB2. Οι θέσεις του δονιδιώματος πάνω στις οποίες συνδέονται οι στεροειδείς και οι θυροειδείς ορμόνες παρουσιάζονται ως: Ανοιχτά βέλη: HREs για τους υποδοχείς της class I, Γεμάτα βέλη: HREs για τους υποδοχείς της class II. Πολλές νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως του Alzheimer's, του Parkinson's και η νόσος του Huntington's, φαίνεται η αιτία γένεσής τους να σχετίζονται με ελαττωματικό μιτοχονδριακό DNA. (Από Psarra and Sekeris, (2008). *Steroid and thyroid Hormone Receptors in Mitochondria. IUMBM Life* 60, 210-223)

Τα μιτοχόνδρια δεν είναι ανεξάρτητες οντότητες αλλά η αντιγραφή και η μετάφρασή τους εξαρτώνται από τη δράση παραγόντων που κωδικοποιούνται από τον πυρήνα. Συνθετάσες του αμινοάκυλο- tRNA εισέρχονται στο μιτοχόνδριο καθώς και όλες οι ριβοσωμικές πρωτεΐνες συνθέτονται έξω από αυτό.

#### **1.4.5 Η μεταγραφή του μιτοχονδριακού γονιδιώματος**

Οι περιοχές του υποκινητή και οι θέσεις έναρξης της μεταγραφής στο ανθρώπινο mtDNA έχουν καταγραφεί από πολλές πειραματικές διαδικασίες, όπως ο προσδιορισμός των 5' άκρων μιτοχονδριακών μεταγραφημάτων με τη δοκιμασία προστασίας από την S1 νουκλεάση και με στοχευμένη μεταλλαξιγένεση. Όλα τα δεδομένα, αποδεικνύουν ότι υπάρχουν 2 θέσεις έναρξης της μεταγραφής στον βρόχο D (ITH1 and ITL), οι οποίες απέχουν μεταξύ τους γύρω στις 150bp. Ο προαγωγέας με την συναινετική του ακολουθία 15kb, 5P-CANACC(G)CC(A)AAAGAYA, περιβάλλει τις θέσεις έναρξης της μεταγραφής. Παρόλη την μικρή απόσταση των δύο υποκινητών, η έναρξη της μεταγραφής γίνεται ανεξάρτητα σε κάθε κλώνο.

Σχετικά με την σύνθεση του RNA, η ελαφριά αλυσίδα μεταγράφεται ως ένα πολυκιστρονικό πρόδρομο mRNA, το οποίο ενσωματώνει σχεδόν όλη την γενετική πληροφορία που περιέχει η αλυσίδα. Αυτό δεν ισχύει και για την βαριά αλυσίδα. Τα rRNAs συντίθενται σε μεγαλύτερο βαθμό απ' ό,τι τα mRNAs που κωδικοποιούνται από την ελαφριά αλυσίδα. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι η Η αλυσίδα έχει δύο θέσεις έναρξης της μεταγραφής.

#### **1.4.6 Ρόλος των μιτοχονδριακών ενζύμων στον μεταβολισμό**

Η μιτοχονδριακή μήτρα περιέχει έναν εκτενές αριθμό ενζύμων που παίζουν κύριο ρόλο σε διάφορα μονοπάτια του μεταβολισμού, όπως ο κύκλος του κιτρικού οξέος, την β-οξειδωτική των λιπαρών οξέων, την οξειδωτική των αμινοξέων, την βιοσύνθεση της αίμης και τον κύκλο της ουρίας. Η ενζυματική μηχανή για την οξειδωτική φωσφορυλίωση βρίσκεται εξ ολοκλήρου στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων.

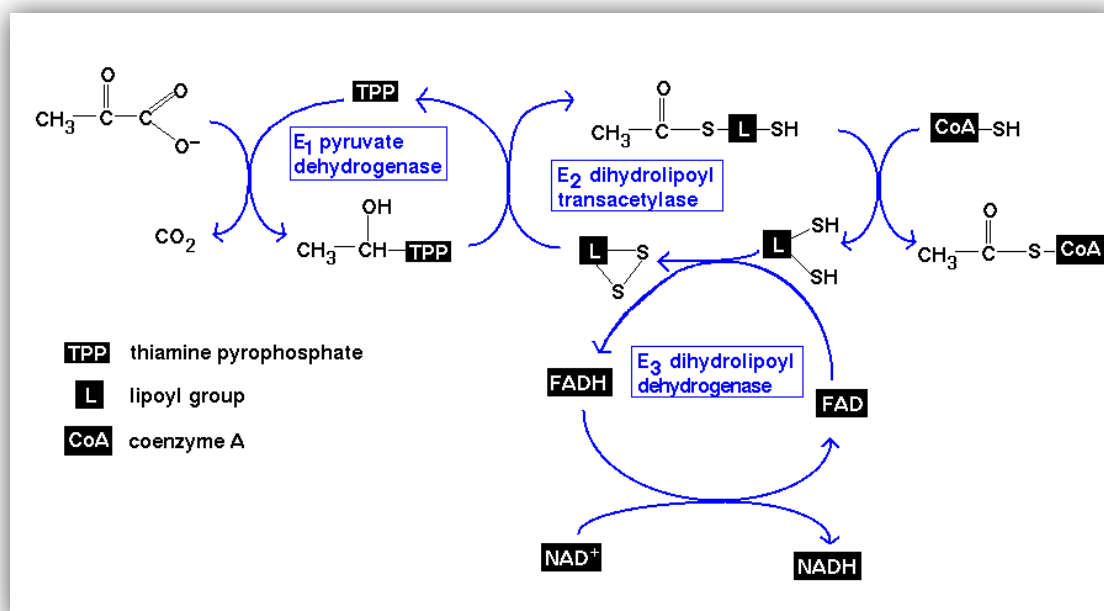
##### **1.4.6.1 Σύμπλεγμα της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης**



Μέσα στην μιτοχονδριακή μήτρα, το πυροσταφυλικό αποκαρβοξυλιώνεται οξειδωτικά από το σύμπλεγμα της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης για να σχηματίσει ακετυλο-CoA. Αυτή η μη αντιστρεπτή αντίδραση είναι ο σύνδεσμος μεταξύ γλυκόλυσης και κύκλου του κιτρικού οξέος. Το σύμπλεγμα της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης είναι ένα μεγάλο σύμπλοκο αποτελούμενο από τρία είδη ενζύμων (Πίνακας 1 ) και καταλύει τέσσερις αντιδράσεις (Εικόνα 13).

**Πίνακας 1. Σύμπλεγμα της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (προσαρμογή από Berg M. et al, Biochemistry 5th edition).**

Ένζυμο	Συντομογραφία	Προσθετική ομάδα	Αντίδραση που καταλύεται
Συνιστώσα της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης	E <sub>1</sub>	TPP	Οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού
Διυδρολιπούλο-τρανσακετυλάση	E <sub>2</sub>	Λιποαμίδιο	Μεταφορά της ακετυλικής ομάδας στο CoA
Διυδρολιπούλο-αφυδρογονάση	E <sub>3</sub>	FAD	Αναγέννηση της οξειδωμένης μορφής του λιποαμιδίου



**Εικόνα 13. Οι αντιδράσεις που καταλύονται από το σύμπλοκο της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (Stryer L., 1981).**



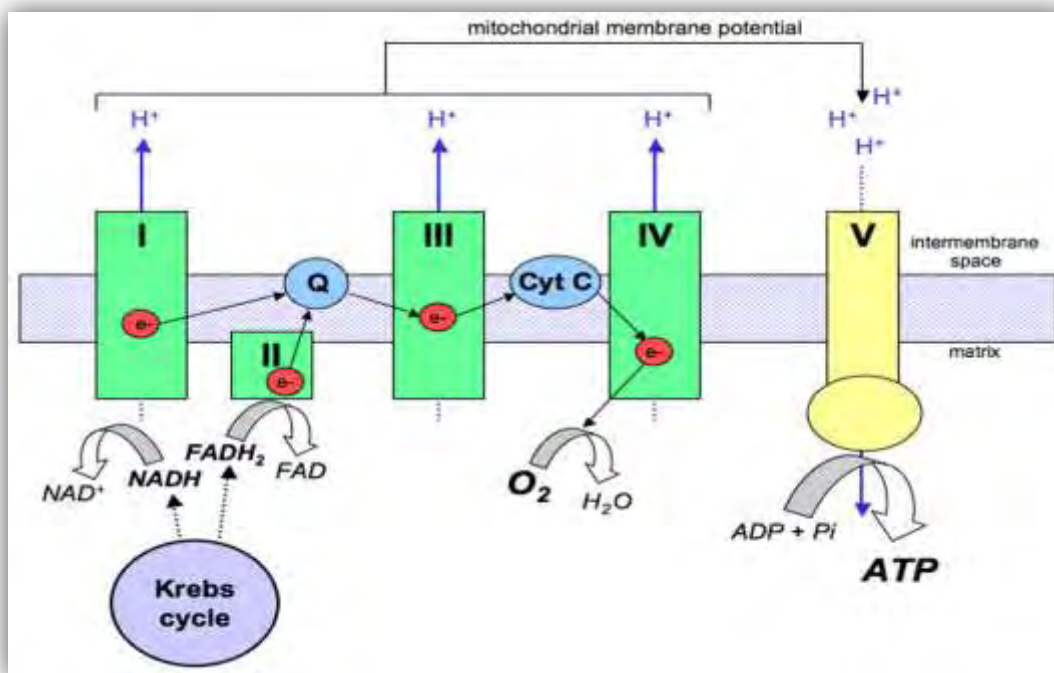
#### 1.4.6.2 Κύκλος του Krebs's και μιτοχόνδρια

Ο κύκλος του κιτρικού οξέος επιτυγχάνει την πλήρη οξείδωση του ακετυλ-coA, ενός μεταβολίτη που παράγεται από πολλά καταβολικά μονοπάτια όπως η γλυκόλυση και η οξείδωση των λιπαρών οξέων. Όλα τα ένζυμα του κύκλου βρίσκονται στην μήτρα των μιτοχονδρίων, εκτός από την ηλεκτρική αφυδρογονάση η οποία είναι μέρος του complex 2 της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων και βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη. Ο κύριος ρόλος του κύκλου του κιτρικού οξέος είναι η πλήρης οξείδωση του ακετυλ-CoA σε 2 μόρια CO<sub>2</sub> και κατά συνέπεια να αποθηκεύσει ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας προς τον σχηματισμό NADH και FADH<sub>2</sub>. Η ανάγκη των περισσότερων κυττάρων σε ενέργεια καλύπτεται με την μορφή του ATP από την οξειδωτική φωσφορυλίωση, στην οποία τα NADH και FADH<sub>2</sub> είναι τα υποστρώματα (Berg J. M. et al, Biochemistry, Fifth Edition).

#### 1.4.6.3 Οξειδωτική φωσφορυλίωση

Στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, το NADH και FADH<sub>2</sub> χρησιμοποιούνται για την αναγωγή μοριακού οξυγόνου σε νερό. Η πολύ εξώεργη αναγωγή του μοριακού οξυγόνου από τα NADH και FADH<sub>2</sub> συμβαίνει μέσω ενός αριθμού αντιδράσεων μεταφοράς ηλεκτρονίων, που διεκπεραιώνεται από ένα σύνολο μεμβρανικών πρωτεϊνών, γνωστών ως *αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων* (Berg J. M. et al, Biochemistry, Fifth Edition).

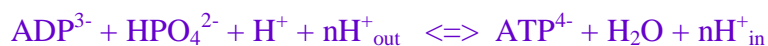
Τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από NADH στο O<sub>2</sub> μέσω μίας αλυσίδας μεγάλων πρωτεϊνικών συμπλόκων τα οποία ονομάζονται οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q, οξειδοαναγωγή του ζεύγους Q-κυτοχρώματος c και οξειδάση του κυτοχρώματος c. Η ροή ηλεκτρονίων δια μέσου αυτών των διαμεμβρανικών συμπλόκων οδηγεί στην άντληση πρωτονίων δια μέσου της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από την οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q στην οξειδοαναγωγή του ζεύγους Q-κυτοχρώματος c, το δεύτερο σύμπλοκο της αλυσίδας, από την ανηγμένη μορφή του συνεχόμενου Q, επίσης γνωστού ως ουβικινόνης. Η ουβικινόνη είναι μία υδρόφοβη κινόνη που διαχέεται γρήγορα στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Η ουβικινόνη επίσης μεταφέρει ηλεκτρόνια από το FADH<sub>2</sub>, το οποίο παράγεται από την ηλεκτρική αφυδρογονάση στον κύκλο του κιτρικού οξέος, στην οξειδοαναγωγή του ζεύγους Q-κυτοχρώματος c, η οποία παράγεται μέσω της αναγωγής του ζεύγους ηλεκτρικού-Q. Το κυτόχρωμα c, μια μικρή διαλυτή πρωτεΐνη, μεταφέρει ηλεκτρόνια από την οξειδοαναγωγή του ζεύγους Q-κυτοχρώματος c στην οξειδάση του κυτοχρώματος c, το τελικό συστατικό στην αλυσίδα και αυτό που καταλύει την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου. Τα σύμπλοκα οξειδοαναγωγής του ζεύγους NADH-Q, αναγωγής του ζεύγους ηλεκτρικού-Q, οξειδοαναγωγής του ζεύγους Q-κυτοχρώματος c και οξειδάση του κυτοχρώματος c ονομάζονται επίσης σύμπλοκα I, II, III και IV αντίστοιχα. Η αναγωγή του ζεύγους ηλεκτρικού-Q (σύμπλοκο II), σε αντίθεση με τα άλλα σύμπλοκα, δεν αντλεί πρωτόνια (Berg J. M. et al, Biochemistry, Fifth Edition).



**Εικόνα 14. Σχηματική αναπαράσταση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στο μιτοχόνδριο.** Ηλεκτρόνια από το NADH και FADH<sub>2</sub> μεταφέρονται μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων στο οξυγόνο ως τελικός δέκτης στο σύμπλοκο IV. Αυτή η κίνηση των ηλεκτρονίων έχει σαν αποτέλεσμα την έξοδο πρωτονίων από την εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, παρέχοντας την απαραίτητη ενέργεια για την ATP συνθάση να παράγει ATP από ADP (Από Protti and Singer *Critical Care* 2006 **10**:228 doi:10.1186/cc5014).

#### 1.4.6.4 Η ATP συνθάση

Η σύνθεση του ATP πραγματοποιείται από ένα μοριακό συγκρότημα στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Αυτό το μιτοχονδριακό σύμπλοκο ονομάζεται μιτοχονδριακή ATPάση ή F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>ATPάση ή σύμπλοκο V. Ο Peter Mitchell διατύπωσε ότι η μεταφορά ηλεκτρονίων και η σύνθεση του ATP είναι συζευγμένες με μια βαθμίδωση συγκέντρωσης πρωτονίων μεταξύ των δύο πλευρών της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Αυτή η ιδέα, η χημειωσμωτική υπόθεση, υποστηρίζει ότι αυτή η πρωτονιοκίνητη δύναμη οδηγεί στην σύνθεση του ATP από το σύμπλοκο συνθάσης του ATP. Η ATP συνθάση είναι ένα ενζυμικό σύμπλοκο βυθισμένο στην εσωτερική μεμβράνη, που μοιάζει με σφαίρα πάνω σε ράβδο. Η σφαίρα, δηλαδή η υπομονάδα F<sub>1</sub> προβάλλει στην μήτρα των μιτοχονδρίων και διαθέτει την καταλυτική δραστηριότητα της συνθάσης. Η υπομονάδα F<sub>1</sub> περιέχει πέντε τύπους πολυπεπτιδικών αλυσίδων με στοιχειομετρία (α<sub>3</sub>β<sub>3</sub>γδε). Οι αλυσίδες των υπομονάδων α και β είναι μεταξύ τους ομόλογες και ανήκουν στην οικογένεια NTPάσης με θηλιά P. Η διάκριση μεταξύ των 3 υπομονάδων β είναι κρίσιμη για το μηχανισμό σύνθεσης του ATP. Η υπομονάδα F<sub>0</sub> είναι ένα υδρόφοβο τμήμα που διασχίζει την εσωτερική μεμβράνη και αποτελεί τον δίαυλο πρωτονίων του συμπλόκου. Η συνθάση του ATP καταλύει τον σχηματισμό της ATP από την ADP και το ορθοφωσφορικό:



Ο Paul Boyer υποστήριξε ότι η πρωτονιωθούμενη σύνθεση της ATP γίνεται μέσω του μηχανισμού αλλαγής της συγγένειας πρόσδεσης. Πιο συγκεκριμένα, οι αλλαγές στις ιδιότητες των τριών υπομονάδων β επιτρέπουν την διαδοχική πρόσδεση του ADP και Pi, τη σύνθεση της ATP και τέλος την απελευθέρωσή της.

## **1.5 Ο Μιτοχονδριακός υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών (mitochondrial Glucocorticoid Receptor, mtGR)**

### **1.5.1 Γενικά**

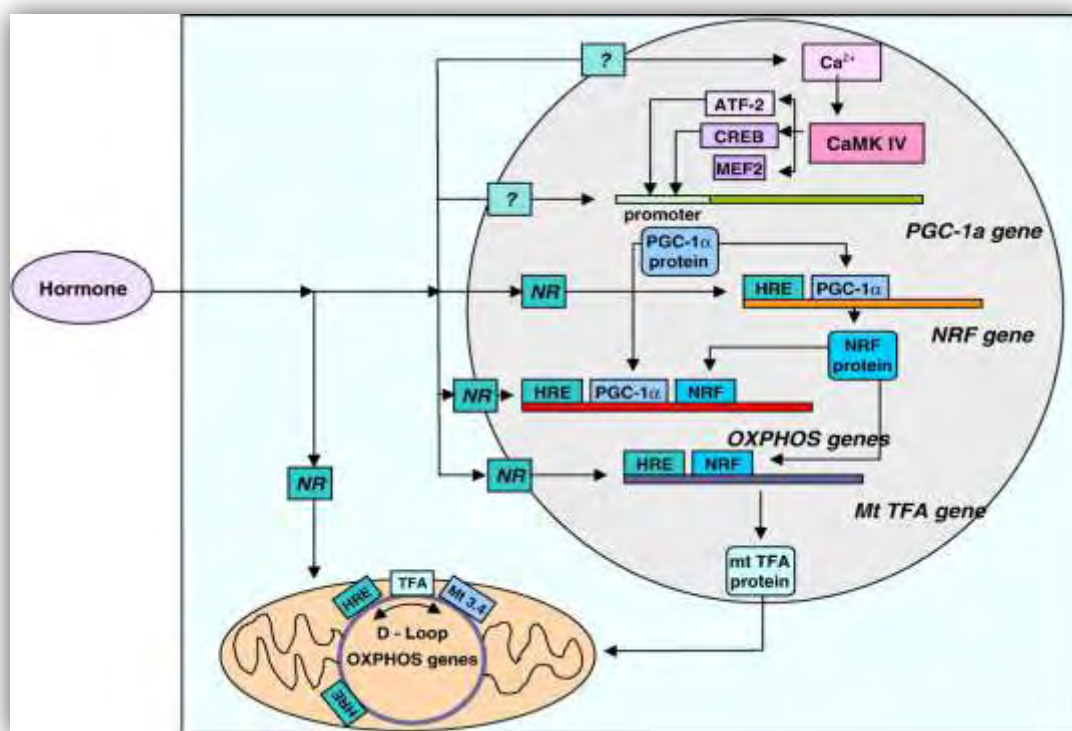
Η μιτοχονδριακή μεταγραφή των OXPHOS ενζύμων επάγεται από τα γλυκοκορτικοειδή και το γεγονός ότι κάποιες υπομονάδες των ενζύμων αυτών κωδικοποιούνται από το πυρηνικό γονιδίωμα και κάποιες άλλες από το μιτοχονδριακό, οδήγησε στην υπόθεση ότι κάτω από ορμονικό ερέθισμα η μεταγραφή των μιτοχονδριακών OXPHOS επηρεάζεται έμμεσα, από επαγόμενα πυρηνικά σινιάλα, όπως μιτοχονδριακούς μεταγραφικούς παράγοντες. Παρόλα αυτά, η παρουσία του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών και αλληλουχιών που ανταποκρίνονται στα γλυκοκορτικοειδή με υψηλή ομολογία με τα GREs στα μιτοχόνδρια, απέδειξε ότι ο μιτοχονδριακός GR μπορεί να επηρεάσει άμεσα την μιτοχονδριακή μεταγραφή, σε συνδυασμό με το έμμεσο πυρηνικό μονοπάτι (Psarra, A.-M. G., Sekeris, C. E., 2009). Ο GR που ανιχνεύτηκε στα μιτοχόνδρια είναι μικρότερου μεγέθους από τον κυτταροπλασματικό, και πιθανόν αποτελεί είτε προϊόν πρωτεόλυσης και παράλληλης αλλαγής διαμόρφωσης του μορίου ώστε να ενεργοποιείται η δράση εσωτερικού μιτοχονδριακού σήματος στόχευσης, είτε αποτελεί μία από της ισομορφές GRαB, GRαC, (Psarra, A.-M. G et al, 2005). Ως εκ τούτου, ο υποδοχέας φαίνεται να κατευθύνεται στα μιτοχόνδρια μέσω μιας εσωτερικής μιτοχονδριακά στοχευμένης ακολουθίας που διαθέτει μια αμφιπαθή έλικα. Έχει προταθεί επίσης, ότι οι πρωτεΐνες που στοχεύουν τα μιτοχόνδρια βρίσκονται σε σύμπλοκο με συνοδές πρωτεΐνες, οι οποίες τις βοηθούν στην μετατόπισή τους στον πυρήνα. Μία κύρια συνοδός πρωτεΐνη αυτής της κατηγορίας είναι η Hsp70.

### **1.5.2 Ρόλος του μιτοχονδριακού GR στη μεταγραφή των μιτοχονδρίων και η επιρροή του στην έκφραση των OXPHOS ενζύμων**

Τα μιτοχόνδρια είναι τα βασικά συστατικά της απόκρισης στο στρες, διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στο οξειδωτικό στρες μέσω της παραγωγής δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS), στην ανοσορύθμιση, στην κυτταρική διαφοροποίηση και στη γήρανση. Διαταραχές των μιτοχονδριακών λειτουργιών έχουν αιτιολογικά συσχετιστεί με νευρομυϊκές εκφυλιστικές παθήσεις, όπως τη νόσο Αλτσχάιμερ, τη νόσο του Πάρκινσον, την αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση κατά πλάκας, και τον

καρκίνο. Αυτός ο κεντρικός ρόλος των μιτοχονδρίων στο μεταβολισμό των κυττάρων, απαιτεί την ενσωμάτωση και το συντονισμό των λειτουργιών τους με εκείνες των άλλων κυτταρικών οργανιδίων, κυρίως του κυτταρικού πυρήνα. Η παραγωγή ενέργειας μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης είναι μια τέτοια λειτουργία, στην οποία τόσο τα πυρηνικά όσο και τα μιτοχονδριακά κωδικοποιούμενα ένζυμα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS) απαιτούνται για το σχηματισμό των ενεργών αναπνευστικών συμπλόκων. Το μιτοχόνδριο είναι ένας αισθητήρας των ενεργειακών αναγκών του κυττάρου, επιτυγχάνοντας διάφορα επίπεδα της προσαρμοστικής ρύθμισης των OXPHOS. Αν οι ενεργειακές ανάγκες δεν είναι επαρκείς, η αναπνευστική αλυσίδα αυξάνει την απόδοση σε ATP με αλλοστερική ενεργοποίηση των OXPHOS από μεταβολίτες, όπως το ADP. Σε περιπτώσεις υψηλότερων ενεργειακών αναγκών, όπως αυτές που προκλήθηκαν από τις γλυκοκορτικοειδείς και θυρεοειδικές ορμόνες στα κύτταρα-στόχους και κατά τη διάρκεια ορισμένων αναπτυξιακών περιόδων, τα κύτταρα αντιδρούν με αυξημένη βιοσύνθεση της OXPHOS ή, σε ακραίες περιπτώσεις, με μιτοχονδριακή βιογένεση, εμπλέκοντας αυξημένη μεταγραφή των πυρηνικών και μιτοχονδριακών γονιδίων OXPHOS και αύξηση της δόσης των γονιδίων (Scheller et al., 2000; Psarra, et al., 2006).

Ο συντονισμός της μεταγραφής των γονιδίων της OXPHOS στα δύο διαμερίσματα των κυττάρων από τα γλυκοκορτικοειδή προέρχεται από τον πυρήνα, όπου το σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα αλληλεπιδρά με τα αντίστοιχα GREs για να επάγει τη μεταγραφή των πυρηνικών γονιδίων OXPHOS καθώς και, τους μεταγραφικούς παράγοντες που ελέγχουν την έκφραση των γονιδίων αυτών (Εικόνα 11). Επιπλέον, ενεργοποιούνται μιτοχονδριακοί μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι μετατοπίζονται στα μιτοχόνδρια. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται ο απαιτούμενος συντονισμός της μεταγραφής των γονιδίων OXPHOS στα δύο κυτταρικά διαμερίσματα. Η παρουσία του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών στα μιτοχόνδρια και των παρόμοιων με τα GREs αλληλουχιών στο γονιδίωμα των μιτοχονδρίων προτείνει μια πρόσθετη λειτουργία του συντονισμού, μέσω μιας άμεσης επίδρασης του μιτοχονδριακά εντοπιζόμενου υποδοχέα στη μιτοχονδριακή μεταγραφή. Ως εκ τούτου, οι κοινοί μεταγραφικοί παράγοντες, οι υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών, που βρίσκονται στον πυρήνα και στο μιτοχόνδριο, οι οποίοι και ενεργοποιούνται από τον ίδιο ρυθμιστικό παράγοντα, την ορμόνη, θα εξασφαλίσουν το συντονισμό μιας διαδικασίας που απαιτεί την παράλληλη μεταγραφή των γονιδίων που εντοπίζονται στα δύο κυτταρικά οργανίδια (Scheller et al., 2000; Psarra, et al., 2006, 2011)



**Εικόνα 15:** Πυρηνικός-κυτταροπλασματικός συντονισμός της μεταγραφής των μιτοχονδριακών και πυρηνικών γονιδίων που κωδικοποιούν υπομονάδες OXPHOS από τις στεροειδείς ορμόνες (γλυκοκορτικοειδή). Στον πυρήνα, το σύμπλοκο ορμόνης-υποδοχέα (HR), μπορεί να αλληλεπιδράσει με τα στοιχεία απόκρισης στις ορμόνες (GREs) των γονιδίων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (OXPHOS), να τα ενεργοποιήσει άμεσα, και με τα GREs των γονιδίων του πυρηνικού αναπνευστικού παράγοντα (NRF), να επάγει τους αντίστοιχους μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι, στη συνέχεια, μπορούν να ασκήσουν μια θετική επίδραση στην μεταγραφή των πυρηνικών γονιδίων της OXPHOS. Μέσω μη γονιδιωματικής ρύθμισης της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού  $\text{Ca}^{2+}$  και ενεργοποίησης της εξαρτώμενης από το σύμπλοκο ασβεστίου-καλμοδουλίνης πρωτεϊνικής κίνησης IV (CaMKIV), του κύριου ρυθμιστή της μιτογένεσης, ο υποδοχέας  $\gamma$  που ενεργοποιείται από το συνενεργοποιητή 1α (PGC-1α) επάγεται, και μπορεί άμεσα και έμμεσα (μέσω της NRF επαγωγής) να διεγείρει τη μεταγραφή των πυρηνικών γονιδίων OXPHOS και του μιτοχονδριακού μεταγραφικού παράγοντα A (mtTFA), ο οποίος ενεργοποιεί τη μιτοχονδριακή μεταγραφή. Οι PGC-1α και PPARα μπορούν, επίσης, να επαχθούν τόσο από τις θυρεοειδικές ορμόνες όσο και από τα γλυκοκορτικοειδή. Ο PGC-1α/1β μπορεί, ακόμη, να επαχθεί από την IFN $\gamma$  μέσω του μονοπατιού JAK/STAT-1. Ο PGC-1α/1β, στη συνέχεια, μπορεί να ενεργοποιήσει το σχετιζόμενο με οιστρογόνα υποδοχέα α (ERRα), ένα ορφανό πυρηνικό υποδοχέα, ο οποίος μέσω άμεσης σύνδεσης με υποκινητές γονιδίων, σημαντικών για λειτουργίες των μιτοχονδρίων, όπως για την οξειδωτική φωσφορυλίωση ή με υποκινητές των παραγόντων που ελέγχουν τη μιτοχονδριακή έκφραση, να οδηγήσει σε αυξημένη μιτοχονδριακή αναπνοή και παραγωγή ROS. Στα μιτοχόνδρια, τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν να επηρεάσουν άμεσα τη μεταγραφή των γονιδίων OXPHOS μέσω των συγγενών τους μιτοχονδριακών υποδοχέων και της αλληλεπίδρασής τους με τις αντίστοιχες θέσεις πρόσδεσης στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα, εξασφαλίζοντας το βέλτιστο συντονισμό της μεταγραφής των γονιδίων OXPHOS και στα δύο γονιδιώματα. Οι ειδικές αλληλουχίες Mt3 και Mt4, που υπάρχουν στη 5'-ανοδική περιοχή των γονιδίων που κωδικοποιούν το σύμπλοκο κυτοχρώματος bc1

και τον D-βρόγχο είναι πιθανές θέσεις δέσμευσης για ακόμα άγνωστους ρυθμιστικούς παράγοντες συντονισμού (Scheller et al., 2000, Psarra et al., 2006). (Από Psarra et al., 2008, BBA 5, 431-436).

### **1.5.3 Ρόλος του μιτοχονδριακού υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στην μεταγραφή γονιδίων**

Οι Psarra et al (2011) απέδειξαν με πειράματα υπερέκφρασης του mtGR σε HEPG2 κύτταρα, ότι ο mtGR προσδένεται στην D loop ρυθμιστική περιοχή του μιτοχονδριακού γονιδιώματος και συμμετέχει άμεσα σε προσδετοεξαρτώμενη αύξηση της σύνθεσης του RNA των μιτοχονδρίων. Επίσης, η αυξημένη έκφραση του υποδοχέα οδηγεί στην ενεργοποίηση της βιοσύνθεσης των OXPHOS ενζύμων και μεταγενέστερα στην αύξηση του συντιθέμενου ATP του οργανιδίου. Παρατηρήθηκε, ακόμη, ότι το γλυκοκορτικοειδές που χρησιμοποιήθηκε (DEX) δεν προκαλούσε την αύξηση της ATP στα μετασχηματισμένα κύτταρα. Αυτό το γεγονός αποτελεί ένδειξη ότι υπάρχουν ρυθμιστικοί μηχανισμοί και μηχανισμοί ανάδρασης (feedback) στην ενεργοποίηση και βιοσύνθεση των OXPHOS ενζύμων (Psarra, A.-M. G, Sekeris C. E., 2011).

### **1.5.4 Ρόλος του μιτοχονδριακού υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στην απόπτωση**

Ο μοναδικός ρόλος των μιτοχονδρίων στην παροχή ATP στο κύτταρο μέσω του μεταβολισμού του οξυγόνου στην αναπνευστική αλυσίδα, οδηγεί πάντα στην δημιουργία δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS), οι οποίες αποτελούν σημαντικούς εγγενής αποπτωτικούς παράγοντες. Έτσι, η διακύμανση της παραγωγής ενέργειας από την αναπνευστική αλυσίδα, μπορεί σε ακραίες περιπτώσεις να αποβεί μοιραία για να την ζωτικότητα του κυττάρου. Τα μιτοχόνδρια λαμβάνουν και ενσωματώνουν ποικίλλα ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά σιγνάλα έναντι και υπέρ της απόπτωσης, παίζοντας έτσι έναν καθοριστικό ρόλο στην ζωή του κυττάρου. Οι αποπτωτικές και οι αντι-αποπτωτικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών εξαρτώνται από την κυτταρική γενεαλογία. Τα γλυκοκορτικοειδή επάγουν απόπτωση στα κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος, ενώ άλλου τύπου κύτταρα όπως του μαστικού αδένος και του ήπατος προστατεύονται από αυτά έναντι αποπτωτικών ερεθισμάτων. Αρκετά γονίδια των εξωγενών και ενδογενών οδών θανάτου εκφράζονται με ένα προ-αποπτωτικό τρόπο σε ευαίσθητα λεμφοειδή κύτταρα εκτεθειμένα σε γλυκοκορτικοειδή, αν και τα επιπρόσθετα σήματα είναι απαραίτητα για να ενεργοποιηθεί η διαδικασία της απόπτωσης. Οι Sionov et al. υπέδειξαν τον ρόλο του mtGR στην επαγωγή της απόπτωσης σε T-λεμφοειδείς κυτταρικές σειρές διαφορετικές ως προς την ευαισθησία τους στα γλυκοκορτικοειδή. Σε αυτά τα κύτταρα, τα γλυκοκορτικοειδή επάγουν τη μετατόπιση του μιτοχονδριακού υποδοχέα από το κυτταρόπλασμα στα μιτοχόνδρια, ενώ στα ανθεκτικά στα γλυκοκορτικοειδή



κύτταρα δεν παρατηρείται τέτοια μετατόπιση. Αυτή η λειτουργία υποδεικνύει μία άμεση σχέση του μιτοχονδριακού υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών στην απόπτωση. Στόχευση στα μιτοχόνδρια ενός υποδοχέα GR άνευ DBD περιοχής, επίσης, οδήγησε σε απόπτωση, οδηγώντας στο συμπέρασμα μιας μη γονιδιωματικής δράσης του GR στη διαδικασία (Sionov, R. V et al, 2006).

## **1.6 ΚΑΡΚΙΝΟΣ**

### **1.6.1 Γενικά**

Ο καρκίνος, επίσης γνωστός με τον όρο κακοήθης όγκος ή κακοήθης νεόπλασμα, είναι μια ομάδα ασθενειών που περιλαμβάνουν τη μη φυσιολογική κυτταρική ανάπτυξη με τη δυνατότητα εισβολής ή εξάπλωσης σε άλλα μέρη του σώματος. Οι όγκοι που αναπτύσσονται τοπικά, χωρίς την διασπορά τους στους γειτονικούς ιστούς, ονομάζονται καλοήθεις (benign), ενώ αυτοί που εισβάλλουν σε άλλους ιστούς και δημιουργούν μεταστάσεις καλούνται κακοήθεις (malignant). Έχει αποδειχθεί ότι η μετατροπή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό με ικανότητα μετάστασης και διήθησης σε παρακείμενο ιστό, δεν αποτελεί διαδικασία ενός σταδίου. Τα φυσιολογικά κύτταρα εξελίσσονται σε κύτταρα με νεοπλασματικούς φαινότυπους μέσω μιας διαδικασίας τριών σταδίων, την έναρξη (initiation), την προαγωγή (promotion) και την πρόοδο (progression). Η πορεία αυτή οδηγείται από μία αλληλουχία τυχαίων μεταλλάξεων και επιγενετικών τροποποιήσεων του DNA που επιδρούν στον έλεγχο των γονιδίων για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση, ζωτικότητα και άλλων διαδικασιών που χαρακτηρίζουν τους νεοπλασματικούς φαινοτύπους. Πολλά στάδια της tumor progression προέρχονται από κληρονομήσιμες μεταλλάξεις που συσσωρεύονται στο γονιδίωμα των αναπτυσσόμενων καρκινικών κυττάρων, κυρίως από σωματικές μεταλλάξεις και μεθυλίωση των προαγωγέων των γονιδίων (Weinberg R. A., 2014).

### **1.6.2 Χαρακτηριστικά καρκινικών κυττάρων**

Κάποια από τα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων είναι η επιτάχυνση του κυτταρικού κύκλου, υπέρμετρη αύξηση, αυξημένη κυτταρική κινητικότητα, χημειοταξία, αλλαγές στην κυτταρική επιφάνεια και έκκριση λυτικών παραγόντων. Μορφολογικά, το καρκινικό κύτταρο χαρακτηρίζεται από έναν μεγάλο πυρήνα, με ακανόνιστο σχήμα και μέγεθος, οι πυρηνίσκοι είναι εμφανής και το κυτταρόπλασμα είναι σπάνιο με έντονα χρώματα ή, αντιθέτως, είναι άχρωμο. Πιο συγκεκριμένα,

- Ο πυρήνας υφίσταται πολλές αλλαγές που έχουν σχέση με την επιφάνειά του, τον όγκο του, την αναλογία πυρήνας/κυτταρόπλασμα, το σχήμα, την πυκνότητα, την δομή και την ομοιογένειά του. Παρατηρείται επίσης, μείωση της ετεροχρωματίνης και αύξηση της ενδοχρωματίνης, αύξηση των πόρων της πυρηνικής μεμβράνης και εγκολπώσεις.

- Το κυτταρόπλασμα επίσης υφίσταται αλλαγές με νέες δομές να εμφανίζονται και κανονικές δομές να εξαφανίζονται. Η συσσώρευση rRNAs και mRNAs μετατρέπει το κυτταρόπλασμα σε βασεόφιλο. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν ένα μικρό ποσοστό κυτταροπλάσματος, όπου συναντώνται συχνά κενोटόπια.
- Τα μιτοχόνδρια μειώνονται σε όγκο με την ανάπτυξη του όγκου. Τα μιτοχόνδρια εμφανίζουν υψηλή μεταβλητότητα στο σχήμα και στον όγκο, καθώς και τεράστια μιτοχόνδρια μπορούν να παρατηρηθούν μερικές φορές. Μη φυσιολογική γλυκόλυση συμβαίνει στις μιτοχονδριακές μεμβράνες, γεγονός που είναι γνωστό στην βιβλιογραφία ως "φαινόμενο Warburg». Επίσης, η διαμήκης κατανομή των μιτοχονδρίων περιλαμβάνει μια ανεπάρκεια της οξειδάσης του κυτοχρώματος (Baba AI, C&atilde;toi C., 2007).

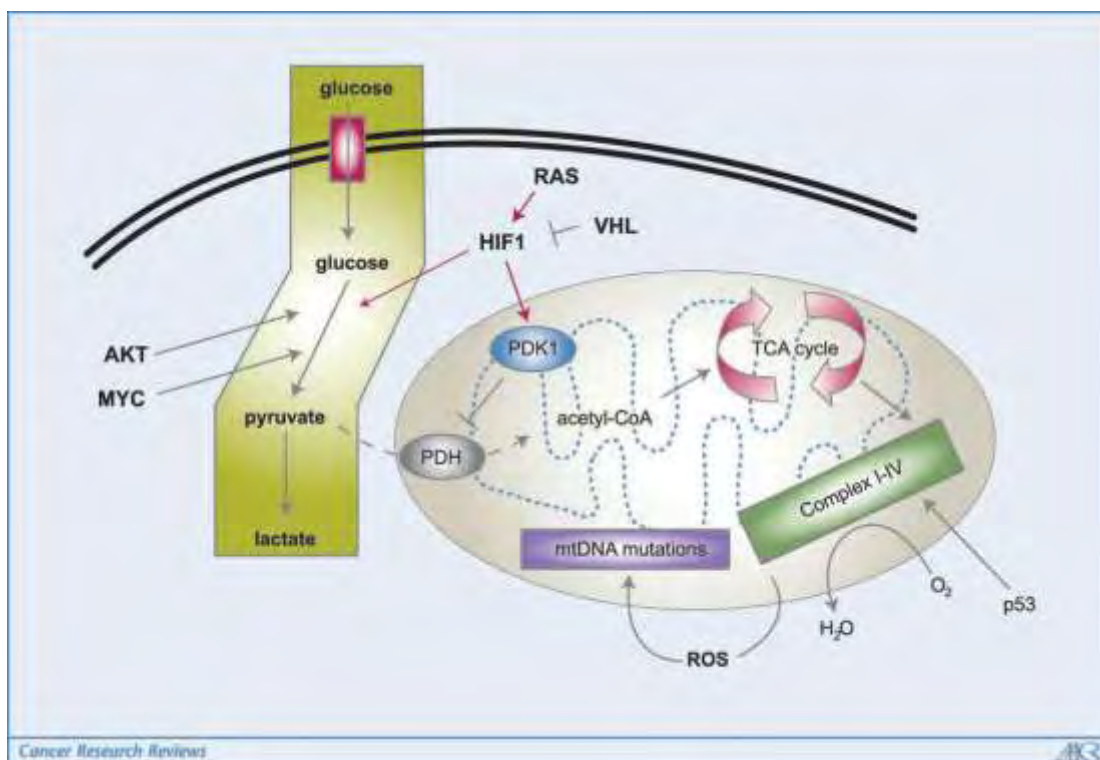
### 1.6.3 Μεταβολισμός καρκινικών κυττάρων - Warburg phenomenon

Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά διαφοροποιημένα κύτταρα, τα οποία βασίζονται στην οξειδωτική φωσφορυλίωση των μιτοχονδρίων για παροχή ενέργειας, τα καρκινικά κύτταρα βασίζονται στην αερόβια γλυκόλυση και στην γαλακτική ζύμωση. Οι αλλαγές στον μεταβολισμό τους, επιτρέπουν στα καρκινικά κύτταρα να ζουν υπό μη ευνοϊκές συνθήκες, όπως η υποξία, αλλά και να ευδοκιμούν και να μεταναστεύουν σε άλλους ιστούς. Σε σύγκριση με τα φυσιολογικά κύτταρα, ο κακοήθης μετασχηματισμός σχετίζεται με:

- αυξημένο ρυθμό εισαγωγής γλυκόζης στα κύτταρα και της γλυκόλυσης
- μειωμένη οξείδωση του πυροσταφυλικού και αυξημένη παραγωγή γαλακτικού οξέος
- αυξημένη γλυκονεογένεση
- μειωμένη β-οξείδωση και αυξημένη de novo σύνθεση των λιπαρών οξέων
- τροποποιημένο μεταβολισμό των αμινοξέων και
- αύξηση του κύκλου των φωσφορικών πεντοζών

Πιθανώς η πιο σημαντική επιστημονική διατύπωση όσον αφορά την δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων και τον υποθετικό τους αιτιολογικό ρόλο στον καρκίνο, προήλθε από τον Νομπελίστα Βιοχημικό Otto Warburg. Κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων του σχετικά με τον μεταβολισμό των καρκινικών κυττάρων, ο Otto Warburg διατύπωσε την άποψη ότι ο νεοπλασματικός μετασχηματισμός προήλθε ως συνέπεια μη αντιστρέψιμης βλάβης στην μιτοχονδριακή αναπνοή (Εικόνα 16). Τα καρκινικά κύτταρα, είναι λοιπόν, εξαναγκασμένα να βασίζονται στην ανεπαρκή γλυκολυτική οδό για την σύνθεση του ATP (2 ATPs/γλυκόζη), παρά στην αναπνοή που παράγει μεταγενέστερα περισσότερα μόρια ATP/γλυκόζη (32 ATPs/γλυκόζη).





**Εικόνα 16. Μοριακή βάση του φαινομένου Warburg.** Το φαινόμενο Warburg περιγράφει την αυξημένη μετατροπή της γλυκόζης σε γαλακτικό οξύ από τα καρκινικά κύτταρα, ακόμα και υπό την παρουσία επαρκούς ποσότητας οξυγόνου το οποίο φυσιολογικά θα χρησιμοποιούνταν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση. Ενεργοποίηση του ογκογονιδίου Akt έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη μεταφορά γλυκόζης και διέγερση της HK2, η οποία αυξάνει τον γλυκολυτικό ρυθμό. Είναι γνωστό ότι το ογκογονίδιο MYC ενεργοποιεί γλυκολυτικά ένζυμα και επιδρά στην μιτοχονδριακή βιογένεση, η παρατεταμένη δράση του όμως καταλήγει στον σχηματισμό ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS). Οι ROS με την σειρά τους, προκαλούν μεταλλάξεις στο mtDNA καθιστώντας τα μιτοχόνδρια δυσλειτουργικά. Το p53 πιστεύεται ότι διεγείρει την αναπνοή μέσω ενεργοποίησης ενός συστατικού της αναπνευστικής αλυσίδας. Επιπρόσθετα με την σταθεροποίηση της υποξίας, ο HIF-1 φαίνεται να αυξάνεται από την RAS και την απώλεια της VHL, που μεσολαβεί στην αποικοδόμησή του. Ο HIF-1 trans-ενεργοποιεί γλυκολυτικά ένζυμα, καθώς και ενεργοποιεί άμεσα το γονίδιο της PDK1, η οποία με την σειρά της αναστέλλει την PDH. Η PDH καταλύει την μετατροπή του πυροσταφυλικού σε ακετυλο-CoA. Το ακετυλο-CoA εισέρχεται στον κύκλο του κιτρικού οξέος και παρέχει ηλεκτρόνια στα σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας στο μιτοχόνδριο. Η αναστολή της PDH από την PDK1 εξασθενεί την μιτοχονδριακή λειτουργία, εκτρέποντας έτσι το πυροσταφυλικό προς το γαλακτικό οξύ (Jung-whan Kim και Chi V. Dang, 2006).

Η αυξημένη απαίτηση γλυκόζης από τα καρκινικά κύτταρα οδηγεί με την σειρά της στην αύξηση της εισαγωγής της γλυκόζης στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων για την διεξαγωγή της γλυκόλυσης (Gabriel D. Dakubo, 2010). Τα σημεία ελέγχου της γλυκόλυσης των καρκινικών κυττάρων συνοψίζονται στον Πίνακα 2.

**Πίνακας 2. Σημεία ελέγχου της γλυκόλυσης στα καρκινικά κύτταρα (Gabriel D. Dakubo, 2010).**

Ρυθμιστικοί παράγοντες	Λειτουργία	Ρόλος στα καρκινικά κύτταρα	Ρύθμιση της γλυκόλυσης
Εξοκινάση (Ισομορφές I, II, III, IV)	Γλυκολυτικό ένζυμο: μετατρέπει την γλυκόζη σε 6-φωσφορική γλυκόζη	Αυξημένη έκφραση (Εξοκινάση II)	Ένζυμο μείωσης του ρυθμού και το πρώτο ένζυμο που φωσφορυλιώνει την γλυκόζη στο εσωτερικό του κυττάρου.  Καθιστά ικανή την αυξημένη είσοδο της γλυκόζης στο κύτταρο.
P13K/Akt	Σηματοδοτικό μονοπάτι των ογκογονιδίων	Ενεργοποιείται σε πολλά καρκινικά κύτταρα από διάφορους μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένων και μεταλλάξεις της PTEN (phosphatase and tensin homolog).	Αυξημένη έκφραση και συμπλεγματοποίηση των μεταφορέων γλυκόζης στην πλασματική μεμβράνη.  Αυξάνει την έκφραση και την δράση της εξοκινάσης 2 καθώς και της φωσφοφρουκτοκινάσης.
MYC και MondoA	Μεταγραφικοί παράγοντες		Επάγουν την έκφραση γλυκολυτικών ενζύμων όπως της εξοκινάσης 2, της ενολάσης, της φωσφοφρουκτοκινάσης και της γαλακτικής αφυδρογονάσης.
HIF	βHLH μεταγραφικός παράγοντας		Αυξάνει την έκφραση των μεταφορέων γλυκόζης.

			<p>Επάγει την έκφραση όλων των γλυκολυτικών ενζύμων.</p> <p>Επάγει την έκφραση και της γαλακτικής αφυδρογονάσης και του μεταφορέα 4 των μονοκαρβοξυλικών.</p> <p>Αναστέλλει την πυροσταφυλική αφυδρογονάση μέσω ενεργοποίησης της PDK1.</p>
P53	<p>Ογκοκατασταλτικό γονίδιο</p> <p>Ο φύλακας του γονιδιώματος</p>	<p>Παρατηρείται μεταλλαγμένο σε διάφορους καρκίνους</p>	<p>Μέσω απώλειας του TIGAR και του SCO2.</p>

#### 1.6.4 Ο ρόλος του συμπλόκου της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης στον φαινότυπο των καρκινικών κυττάρων.

Το σύμπλοκο της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (PDC) ρυθμίζεται στενά από διάφορες ισομορφές κινάσων της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (PDK-1-4) και φωσφατάσων της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης (PDP1,2). Η ρύθμιση αυτή είναι η αντιστρεπτή φωσφορυλίωση της E1α υπομονάδας της PDH (PDHα). Πρόσφατα ταυτοποιήθηκε πως η έκφραση του γονιδίου της PDK-1 εξαρτάται από τον HIF-1, γεγονός που συνδέει την ενεργοποίηση του HIF-1 με την μείωση της οξείδωσης της γλυκόζης μέσω της φωσφορυλιωμένης PDHα και αναστολή του PDC. Οι McFate T. et al., απέδειξαν με την δημιουργία knockout ποντικών που στερούνταν την PDK-1, ότι η λειτουργία του PDC αποκαθίσταται, ανατρέπεται ο μεταβολικός φαινότυπος του Warburg, μειώνεται η έκφραση του HIF-1α και αναστέλλεται η ανάπτυξη όγκων. Η αποσαφήνιση των δράσεων των μεταβολιτών που ελέγχουν το PDC, υποδείχνει πως, όπως η υποξία, μεταβολές στην πορεία της γλυκόζης στα καρκινικά κύτταρα μπορεί άμεσα να έχει αντίκτυπο στην κακοήθης πρόοδο. Η εύρεση και η ανάπτυξη κατάλληλων αναστολέων της PDK-1 αλλά και των βιταμινών και συνενζύμων

απαραίτητων για την δραστηριότητα του PDC, με στόχο τη διόρθωση των μεταβολικών ανωμαλιών προσφέρει μοναδικές πιθανότητες στην αντιμετώπιση του καρκίνου και στην πιθανή συνεργατικότητα με άλλες καρκινικές θεραπείες (McFate T. et al., 2008).

## 2 ΣΚΟΠΟΣ

Οι στεροειδείς ορμόνες συμμετέχουν σε σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες όπως το μεταβολισμό, τη φλεγμονή, τη λειτουργία του ανοσοποιητικού και νευρικού συστήματος, καθώς και τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και τη διαφοροποίηση. Τα γλυκοκορτικοειδή, είναι μία κατηγορία στεροειδών ορμονών, τα οποία εκκρίνονται από την φλοιώδη μοίρα των επινεφριδίων και από τις γονάδες. Τα γλυκοκορτικοειδή είναι κύριοι ρυθμιστές πληθώρα κυτταρικών λειτουργιών, που μεταδίδουν το μήνυμά τους στα κύτταρα στόχους μέσω των υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών που εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και αποτελεί μέλος της υπεροικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων. Οι υποδοχείς γλυκοκορτικοειδών είναι προσδετοεξαρτώμενοι μεταγραφικοί παράγοντες και όταν συνδέονται με τις ορμόνες μετατοπίζονται ως σύμπλοκο στον πυρήνα, όπου ο υποδοχέας συνδέεται στα στοιχεία GREs και ρυθμίζει τη μεταγραφή των αποκρινόμενων γονιδίων.

Μέχρι πρόσφατα, η μοναδική δράση των γλυκοκορτικοειδών θεωρούνταν η ρύθμιση της μεταγραφής του πυρηνικού γονιδιώματος. Τα τελευταία χρόνια πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι τα γλυκοκορτικοειδή μπορεί να έχουν και μη γενωμικές δράσεις μέσω μεμβρανικών υποδοχέων, όπως επίσης μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση γονιδίων αναπνευστικής αλυσίδας - οξειδωτικής φωσφορυλίωσης μέσω αφενός έμμεσης πυρηνικής δράσης αλλά και αφετέρου μέσω άμεσης μιτοχονδριακής δράσης. Η ανακάλυψη του GR στα μιτοχόνδρια, η παρουσία των παρόμοιων με τα πυρηνικά στοιχεία GREs αλληλουχιών στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα, καθώς και η δυνατότητα σύνδεσης του υποδοχέα με αυτά τα στοιχεία συντελούν στην επιβεβαίωση της υπόθεσης της άμεσης δράσης του mtGR στη μεταγραφή του μιτοχονδριακού γονιδιώματος και κατά συνέπεια της συμβολής του στη βιοσύνθεση των μιτοχονδριακά κωδικοποιημένων υπομονάδων των συμπλόκων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στο υποκυτταρικό αυτό διαμέρισμα.

Σημαντικό ποσοστό καρκινικών κυττάρων διακρίνονται από έναν συγκεκριμένο μεταβολικό φαινότυπο, κατά τον οποίο αποφεύγεται η παραγωγή ενέργειας μέσω της διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Αντίθετα επιτελείται σε αυτά αερόβια γλυκόλυση. Καθοριστικό ρόλο στη μεταβολική αυτή μετατροπή παίζει η απενεργοποίηση του PDC. Ο πλήρης χαρακτηρισμός των μηχανισμών ελέγχου της διατήρησης του συμπλόκου της PDH σε ενεργή μορφή, και κατά συνέπεια αντιστροφής αυτής της μεταβολικής διαταραχής θα συντελέσει στην φαρμακευτική προσέγγιση και ίαση αυτών των μεταβολικών διαταραχών στον καρκίνο..

Ενδεχομένως ο mtGR ως κρίσιμος ρυθμιστής του μεταβολισμού και γενικότερα της φυσιολογίας του κυττάρου να συμμετέχει ως ρυθμιστής της αναστροφής ή αποφυγής του φαινομένου. Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η διερεύνηση των μορίων που αλληλεπιδρούν άμεσα ή έμμεσα με το μιτοχονδριακό υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών αποσκοπώντας έτσι στην περαιτέρω κατανόηση του μηχανισμού δράσης και σηματοδότησης του υποδοχέα στο μιτοχονδριακό περιβάλλον του.

### **3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

#### **3.1 Υλικά**

##### **3.1.1 Διαλύματα**

- 1) Θρεπτικό διάλυμα για καλλιέργεια κυττάρων HepG2mtGFPGR  
DMEM  
10% FBS  
1% πενικιλίνη/στρεπτομικίνη  
1% αμινοξύ L-γλουταμίνης με τελική συγκέντρωση 2 mM
- 2) Διάλυμα ανακαλλιέργειας μονόστοιβων κυττάρων (θρυψινοποίηση)  
Θρυψίνη-EDTA (0,25% in 1 mM EDTA)
- 3) Διαλύματα κλασμάτωσης (απομόνωσης μιτοχονδρίων από κυτταροκαλλιέργειες)
  - i. PBS
  - ii. Buffer A: Hepes-KOH 20mM pH 7,5  
KCl 10 mM  
MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM  
EDTA 1 mM  
EGTA 1 mM  
DTT 2 mM  
PMSF 0,1 mM  
Sucrose 250 mM
  - iii. Buffer B: Tris 20mM pH 7,5  
Mannitol 0,21 mM  
EDTA 2,5 mM  
Sucrose 0,07 mM
- 4) Κρυοπροστατευτικό διάλυμα κυττάρων:
  - i DMSO 10%
  - ii FBS 90%
- 5) Διαλύματα ανοσοκατακρήμνισης
  - i RIPA buffer: 10 mM Tris/HCl, pH 8.0,  
150 mM NaCl

1mM EDTA

0.1% Nonidet P40 Εμπλουτισμένο με μίγμα αναστολέων  
πρωτεασών (1/100)

ii PBS 1X: 91mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

17mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

1500 mM NaCl

6) Διαλύματα για ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου  
υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS page)

i Ανάλογα με την συγκέντρωση του ακρυλαμίδιου και τον τελικό βαθμό  
διαχωρισμού των πρωτεϊνών , χρησιμοποιούνται και ανάλογοι όγκοι  
των διαλυμάτων: separating και stacking gels σύμφωνα με τον  
παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 3. Οι αναλογίες των separating και stacking gels ανάλογα με την  
συγκέντρωση πολυακρυλαμίδιου.**

Διαλύματα	Separating gel			Stacking gel (4%)
	(7,5%) (12%)		(10%)	
ddH <sub>2</sub> O	2,738 ml	2,025 ml	2,425 ml	2,175 ml
Tris-HCl 1,5M, pH=8,8	1,25 ml	-	1,25 ml	1,25 ml
Tris-HCl 1,5M, pH=6,8	-	0,21 ml	-	-
SDS 10%	50 µl	25 µl	50 µl	50 µl
Ακρυλαμίδιο 40% v/w	0,9375 ml	0,25 ml	1,25 ml	1,5 ml
APS	25 µl	12,5 µl	25 µl	25 µl
TEMED	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl

ii Loading buffer: 1,5 M Tris pH 6.8

10% Γλυκερόλη

10% SDS

5% β-Μερκαπτοαιθανόλη

1% Μπλε της βρωμοφαινόλης

- 7) Διαλύματα για Silver Staining protocol για 2D gels συμβατά με φασματοσκοπίας μάζας
- 8) Διάλυμα Bradford  
Coomassie Brilliant Blue G-250  
95% ethanol  
85% (w/v) phosphoric acid.

### 3.1.2 Χημικά

- AgNO<sub>3</sub>
- APS
- DMEM (Sigma, Gibco)
- DMSO
- DTT
- EDTA
- EGTA
- Fetal Bovine Serum FBS (Gibco)
- HEPES-KOH
- HCl
- KCl
- MgCl<sub>2</sub>
- Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>
- NaCl
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- NaOH
- PMSF
- SDS (Sodium dodecyl sulfate) (Sigma)
- Temed (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)
- Tris base
- Trypsin-EDTA 5% 10x
- Tween 20
- Αιθανόλη
- Ακρυλαμίδιο
- β-Μερκαπτοαιθανόλη
- Γλυκερόλη
- Γλυκίνη
- Bis-ακρυλαμίδιο
- Μανιτόλη
- Μεθανόλη
- Μπλε της βρωμοφαινόλης
- Οξικό οξύ



- Σουκρόζη
- Μίγμα αναστολέων πρωτεασών (Sigma)

### 3.1.3 Αντισώματα

Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την διαδικασία της ανοσοκατακρήμνισης:

- 1) 2F8 μονοκλωνικό αντίσωμα anti-GR
- 2) mouse-IgG: control

### 3.1.4 Όργανα

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν στεγάζονται από το Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας και στην Αίθουσα Κυτταροκαλλιέργειών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας .

- Επωαστικός Κλίβανος
- Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής αέρα (Laminar Air Flow – AV-30/70)
- Ζυγός
- Μικροσκόπιο
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Υδατόλουτρο
- Φυγόκεντρος τύπου centrifuge 5810R eppendorf
- Φυγόκεντρος τύπου centrifuge 5415R
- Συσκευή υπερήχων (Sonicator)

## 3.2 Μέθοδοι

### 3.2.1 Κυτταροκαλλιέργειες

Για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά HepG2 (Human hepatocellular liver carcinoma cell line). Τα HepG2 είναι μία αθανатоποιημένη κυτταρική σειρά, που απομονώθηκε αρχικά από τον ηπατικό ιστό ενός ατόμου 15 ετών Καυκάσιο Αμερικάνο με διαφοροποιημένο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα.

Τα HepG2 mtGFPGR είναι κύτταρα τα οποία εκφράζουν σταθερά τον ανθρώπινο υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών με μια μιτοχονδριακά στοχευμένη πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP) στο αμινοτελικό του άκρο. Τα δείγματα παρασκευάστηκαν απ'ο την Δρ Ψαρρά ΑΜ όπως περιγράφεται στο Psarra & Sekeris 2011. Συνοπτικά, για τη δημιουργία της σταθερά μετασηματισμένης κυτταρικής σειράς, χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα κύτταρα HepG2, τα οποία καλλιεργήθηκαν και ετοιμάστηκαν για διαμόλυνση. Για την επίτευξη της σταθερής έκφρασης του μιτοχονδριακού GR, η

ακόλουθη

αλληλουχία:

atggctcagcgacttcttctgaggaggttctggcctctgtcatctccaggaagccctctcagggtcagtgccaccctca  
cttcagagccctgcagacccacaaatgcagtcctggtggcctgtgtaacacccaacccagcccgacaataatacacca  
cgaggatctcttgaca, η οποία κωδικοποιεί ένα μιτοχονδριακά στοχευμένο πεπτίδιο,  
εισάχθηκε σε πλαίσιο μαζί με το ενισχυμένο γονίδιο της πράσινης φθορίζουσας  
πρωτεΐνης (enhanced GFP), μεταξύ των περιοχών *NheI* και *AgeI* του φορέα pEGFPC2  
(Clontech), για την παραγωγή του pmtEGFPC2 πλασμιδίου. Ακολούθως, το γονίδιο  
του ανθρώπινου GR (X03225 accession no.) εισήχθηκε στο pmtEGFPC2 στην  
περιοχή *BamHI* (pmtEGFPC2-GR). Στη συνέχεια με τη χρήση Lipofectamine 2000  
τα HepG2 κύτταρα επιμολύνθηκαν με τους πλασμιδιακούς φορείς pmtEGFPC2-GR  
και pmtEGFPC2 για την παρασκευή HepG2 mtGFPGR και HepG2 mtGFP  
κυττάρων. (Psarra, A.M.G., Sekeris, C.E, (2011).

### 3.2.2 Καλλιέργεια κυττάρων HepG2 mtGFPGR

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM με περιεκτικότητα D-γλυκόζης 4.5g/L, εμπλουτισμένο με 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 100U/ml πενικιλίνη, 100μg/ml στρεπτομυκίνη και 2mM L-γλουταμίνη. Το DMEM είναι ένα θρεπτικό μέσο για κυτταροκαλλιέργειες ζωικών κυττάρων σε μορφή διαλύματος. Παρέχεται από το εμπόριο αποστειρωμένο και περιέχει τις απαραίτητες ποσότητες όλων των αμινοξέων, πολλές βιταμίνες, αυξητικούς παράγοντες και πολλά ανόργανα άλατα τα οποία εξασφαλίζουν κατάλληλη οσμωτική πίεση. Επιπρόσθετα περιέχει και ένα σάκχαρο, την γλυκόζη που μαζί με την γλουταμίνη η οποία προστίθεται πριν από την χρησιμοποίηση του μέσου, αποτελούν την πηγή άνθρακα για την κυτταρική ανάπτυξη. Επίσης, περιέχεται στο θρεπτικό και ένας δείκτης pH, το ερυθρό της φαινόλης (phenol red), που επιτρέπει την παρακολούθηση του pH των κυτταροκαλλιεργειών, καθώς η περιοχή του pH για ανάπτυξη είναι μεταξύ του 7,1-7,5. Το DMEM που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρίας Gibco.

Το FBS είναι ο ορός, το κλάσμα του αίματος που απομένει μετά την φυσική πήξη του αίματος, εμβρύου μόσχου. Λαμβάνεται μετά από φυγοκέντρηση του αίματος για να απομακρυνθούν οποιαδήποτε εναπομείναντα ερυθρά αιμοσφαίρια. Η διαδικασία λαμβάνει χώρα μέσα σε κλειστό σύστημα συλλογής στο σφαγείο. Ο ορός εμβρύου μόσχου είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο ορό συμπλήρωμα για την *in vitro* κυτταρική καλλιέργεια ευκαρυωτικών κυττάρων. Αυτό οφείλεται στο ότι περιέχει ένα πολύ χαμηλό επίπεδο αντισωμάτων ενώ περιέχει περισσότερους παράγοντες ανάπτυξης, επιτρέποντας ευελιξία σε πολλές διαφορετικές εφαρμογές κυτταρικής καλλιέργειας. Η σφαιρική πρωτεΐνη, αλβουμίνη βόειου ορού (BSA), είναι ένα σημαντικό συστατικό του ορού εμβρύου μόσχου. Η πλούσια ποικιλία των πρωτεϊνών σε ορό εμβρύου μόσχου διατηρεί καλλιεργημένα κύτταρα σε ένα μέσο στο οποίο μπορούν να επιβιώσουν, να αναπτυχθούν και να διαιρεθούν (Jochems, Carlo; et al. (April–March 2002).

Το θρεπτικό υλικό των φλασκών ανανεωνόταν σχεδόν κάθε 48 ώρες, ανάλογα με την κατάσταση της καλλιέργειας (% confluent). Οι φλάσκες (μικρές και μεγάλες) φυλάσσονταν σε επωαστικό κλίβανο ρυθμισμένο σε θερμοκρασία 37°C και υγρή ατμόσφαιρα 95% αέρος και 5% διοξειδίου του άνθρακα (CO<sub>2</sub>).

### **3.2.3 Ανακαλλιέργεια μονόστοιβης καλλιέργειας με θρυψίνη (θρυψινοποίηση):**

Όταν η καλλιέργεια έφτανε το 70-80% confluent, πραγματοποιούνταν θρυψινοποίησή της με θρυψίνη και μεταφορά κάποιας ποσότητάς της σε νέα φλάσκα ή σε πιάτα. Η θρυψίνη είναι μία ενδοπεπτιδάση και παράγεται από τα γαστρο-έντερικό επιθήλιο των θηλαστικών. Έχει βέλτιστο pH 7,5-8,5 και βέλτιστη θερμοκρασία στους 37,1°C. Η διαδικασία αυτή γινόταν γιατί τα κύτταρα δεν θα είχαν άλλο χώρο να αναπτυχθούν, θα συσσωρεύονταν τοξικά παράγωγα του μεταβολισμού τους και θα άρχιζαν να αναπτύσσονταν προς τα πάνω.

Μετά από παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο και επιβεβαίωση της μορφολογίας τους, ακολουθούσε ξεπάγωμα του DMEM και της θρυψίνης στο υδατόλουτρο για 20 min. Όλη η διαδικασία πραγματοποιούνταν υπό άσηπτες συνθήκες (θάλαμος κάθετης νηματικής ροής αέρα, Laminar Air Flow). Αρχικά, γινόταν αφαίρεση του θρεπτικού υλικού από την φλάσκα με γυάλινη πιπέτα Pasteur, προσθήκη 3 ml θρυψίνης για 75 cm<sup>2</sup> ή 1 ml για 25 cm<sup>2</sup> και τοποθέτηση στον επωαστήρα. Μετά από 5 περίπου λεπτά (ανάλογα με την αρχική μορφολογία της καλλιέργειας), ακολουθούσε παρατήρηση στο μικροσκόπιο και αν είχαν σηκωθεί τα κύτταρα από τον πάτο της φλάσκας, τοποθετούνταν στο laminar air flow για τον σταματημό της αντίδρασης με προσθήκη 4 X της αρχικής ποσότητας θρυψίνης θρεπτικού υλικού. Διαβρεχόταν διεξοδικά όλη η επιφάνεια της φλάσκας με DMEM και συλλεγόταν όλη η ποσότητα σε falcon για φυγοκέντρηση στα 1000 rpm, 5 min, 27 °C. Έπειτα, απομακρυνόταν το υπερκείμενο και στον πυθμένα του falcon παρέμεναν τα κύτταρα. Ανάλογα με τον αριθμό των plates και της χωρητικότητάς τους για ανακαλλιέργεια, προσθέτονταν στο falcon με τα κύτταρα και η ανάλογη ποσότητα DMEM. Για παράδειγμα, για ανακαλλιέργεια σε 3 plates (25 ml) προσθέτονταν 19 ml DMEM σε κάθε plate, 15 ml DMEM στην αρχική φλάσκα (για ανακαλλιέργεια) και 3,3 ml στο falcon (1 ml κυττάρων για κάθε plate). Τα κύτταρα στο falcon επαναδιαλυτοποιούνταν και χωρίζονταν ισότιμα τα 3 ml σε κάθε ένα plate και το 0,1 ml στην φλάσκα. Τέλος, τοποθετούνταν στον επωαστήρα.

### **3.2.4 Απόψυξη κυττάρων**

Η διατήρηση των κυττάρων για μεγάλο χρονικό διάστημα έγινε με αποθήκευσή τους σε υγρό άζωτο (-196°) ή στους -80°C και ενώ βρίσκονταν σε λογαριθμική φάση. Ως κυτταροπροστατευτική ουσία χρησιμοποιήθηκε διάλυμα DMSO, το οποίο εμποδίζει την κρυστάλλωση του νερού και είναι οργανικός διαλύτης. Η διαδικασία

που ακολουθήθηκε για την απόψυξη κυττάρων ήταν η εξής: Αρχικά, τοποθετήθηκε το δείγμα-stock σε ξηρό πάγο από τους  $-80^{\circ}\text{C}$ . Σε ασηπτικές συνθήκες, προετοιμάστηκε ένα falcon με 9 ml DMEM. Από τον ξηρό πάγο, το δείγμα τοποθετήθηκε στο υδατόλουτρο για μικρό χρονικό διάστημα-μέχρι να ξεπαγώσει. Πολύ γρήγορα, το 1 ml δείγματος προστιθόταν στο falcon και ακολουθούσε φυγοκέντρωση σε 1000 rpm, 5 min,  $27^{\circ}\text{C}$  με σκοπό την απομάκρυνση του DMSO. Γινόταν επαναδιαλυτοποίηση των κυττάρων σε 5 ml θρεπτικού υλικού, μεταφερόταν σε  $25\text{ cm}^2$  φλάσκα και τοποθετούνταν στον επωαστήρα.

### 3.2.5 Ψύξη κυττάρων

Όταν μία καλλιέργεια έφτανε να είναι confluent  $> 80\%$ , πραγματοποιούνταν ψύξη κάποιας ποσότητας κυττάρων της. Η μέθοδος πραγματοποιούνταν σε ασηπτικές συνθήκες. Η μέθοδος είναι ίδια με αυτή της επανακαλλιέργειας μέχρι το τέλος της φυγοκέντρωσης. Από εκεί, αφαιρούνταν το θρεπτικό με αναρρόφηση και γινόταν επαναδιαλυτοποίηση των κυττάρων σε 2 ml FBS. Σε 2 cryo-tubes, προσθέτονταν 0,9 ml κυτταρικού διαλύματος και 0,1 ml DMSO. Έπειτα από γρήγορη ανάδευση, φυλάσσονταν στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.6 Κλασμάτωση για απομόνωση μιτοχονδρίων

Για την απομόνωση των μιτοχονδρίων από τα HepG2 κύτταρα, γίνονταν επιστρώσεις κυττάρων σε πιάτα (3) των 20 ml, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Στον εργαστηριακό πάγκο, τοποθετούνταν τα πιάτα σε πάγο και αφαιρούνταν το θρεπτικό υλικό με την αναρρόφηση. Ακολουθούσε ξέπλυμα των κυττάρων με 10 ml PBS 1X (3 φορές) και προσθήκη του buffer ομογενοποίησης (buffer A). Το buffer ομογενοποίησης έχει ωσμωμοριακότητα ίση με 300 Osm για να διατηρηθεί η ακεραιότητα των υποκυτταρικών οργανιδίων και περιέχει αναστολείς ενζύμων έτσι ώστε όταν πραγματοποιείται η λύση των κυττάρων και απελευθερώνονται πρωτεολυτικά ένζυμα να μην καταστρέφονται οι πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα το DDT διατηρεί ανηγμένους τους δισουλφιδικούς δεσμούς και το PMSF είναι αναστολέας πρωτεολυτικών ενζύμων. Όλα τα υλικά διατηρούνταν σε πάγο.

Η συλλογή κυττάρων από τα πιάτα γινόταν με το scraper με προσοχή για την συλλογή όσο το δυνατόν περισσότερων κυττάρων και μεταφορά σε ειδικό φιαλίδιο του Potter Elvehjem ομογενοποιητή. Ακολουθούσε η ομογενοποίηση των κυττάρων, η οποία αποτελούνταν από 2 σετ των 10 φορών πάνω κάτω το δοχείο ομογενοποίησης στον ομογενοποιητή στα 2000rpm περίπου, με ενδιάμεση παύση 2 λεπτών λόγω ανάπτυξη θερμότητας. Το κυτταρικό εναιώρημα σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας βρισκόταν στον πάγο.

Το κυτταρικό εναιώρημα συλλεγόταν και ακολουθούσε φυγοκέντρωση στα 1000 x g (2500 rpm) για 5 min. Έπειτα, αφαιρούνταν το ίζημα (πυρήνες, άσπαστα κύτταρα)

και το υπερκείμενο τοποθετούνταν σε eppendorfs για φυγοκέντρωση στις 12000 rpm για 20 min στους 4 °C για την κατακρήμνιση υποκυτταρικών οργανιδίων όπως το ενδοπλασματικό δίκτυο, τα λυσοσώματα και τα μιτοχόνδρια. Τα μιτοχόνδρια καθιζάνουν και επαναδιαλυτοποιούνται σε buffer B. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλες 2 φορές, με σκοπό την έκλυση και απομάκρυνση κυτταροπλασματικών συστατικών. Τέλος, τα ιζήματα που αντιπροσώπευαν το υποκυτταρικό κλάσμα εμπλουτισμένο σε μιτοχόνδρια (MITOS) φυλάσσονταν στους -80 °C. Το υπερκείμενο της δεύτερης φυγοκέντρωσης (1000 x g) αποτελούσε το μετα-μιτοχονδριακό κλάσμα το post-mitochondrial (PM) και αποτελούνταν από κυτταρόπλασμα και κυτταρικά οργανίδια. Το υπερκείμενο της πρώτης φυγοκέντρωσης ήταν το total extract (TE), που περιείχε μιτοχόνδρια, κυτταρόπλασμα και μεμβράνες και συλλεγόταν από την μικρή ποσότητα που περίσσευε στο φιαλίδιο του ομογενοποιητή.

### **3.2.7 Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών των μιτοχονδρίων των HepG2mtGFRGR**

*Στην παρούσα διπλωματική πραγματοποιήθηκε 2 φορές η πειραματική διαδικασία της ανοσοκατακρήμνισης με διαφορετικό σε κάποια σημεία πρωτόκολλο (1<sup>η</sup> μέθοδος και 2<sup>η</sup> μέθοδος)*

Η ανοσοκατακρήμνιση αποτελεί μία μορφή χρωματογραφίας συγγένειας. Σε αυτήν, ως στερεή φάση χρησιμοποιούνται σφαιρίδια από αгарόζη ή κάποιο ανάλογο υλικό. Πάνω στα σφαιρίδια βρίσκεται ομοιοπολικά δεσμευμένη πρωτεΐνη A και πρωτεΐνη G, πρωτεΐνες βακτηριακής προέλευσης που δεσμεύουν με μεγάλη συγγένεια την Fc περιοχή ορισμένων τύπων IgG ανοσοσφαιρινών. Με τη χρήση της δημιουργείται ένασύμπλοκο σφαιριδίων-πρωτεϊνών A και G-αντισωμάτων στο οποίο δεσμεύεται επιλεκτικά το αντιγόνο προς κατακρήμνιση. Το σύμπλοκο αυτό είναι δυνατό να συλλεχθεί μετά από φυγοκέντρωση και οι πρωτεΐνες που υπάρχουν σε αυτό να αποδεσμευτούν με τη χρήση αποδιατακτικών παραγόντων.

#### **3.2.7.1 1<sup>η</sup> μέθοδος**

Αρχικά, προετοιμάστηκαν τα σφαιρίδια αгарόζης-IgA, IgG, τα οποία ήταν 25 μl/ δείγμα αντισωμάτων που εξετάζονταν. Τα σφαιρίδια φυλάσσονται σε περίσσεια 70 % αιθανόλης για να μην στεγνώσουν. Η αιθανόλη απομακρύνθηκε σε πρώτη φάση με φυγοκέντρωση των σφαιριδίων στα 2000 rpm για 3 min. Ακολούθησε αφαίρεση της αιθανόλης, πρόσθεση 1 ml διαλύματος RIPA, ανάδευση 5 min και φυγοκέντρωση 5 min στα 2000 rpm στους 4 °C. Αυτό το στάδιο επαναλήφθηκε 3 φορές.

Μετά τις εκπλύσεις, απομακρύνθηκε το RIPA και προστέθηκε 350 μl RIPA και 5 μl αντισωμάτων. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: 2F8 (μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών, ευγενική προσφορά από τον Δρ. Μιχάλη Αλέξη, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών) και mIgG. Τα σφαιρίδια επώαστηκαν με τα αντισώματα για 4 ώρες, υπό ανάδευση, στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και

ακολουθούν 3 εκπλύσεις με 1ml RIPA, με ανάδευση για 5 λεπτά και φυγοκέντρωση για 3 λεπτά στις 2000rpm, στους 4°C.

Στα μιτοχονδριακά εκχυλίσματα των κυττάρων HepG2mtGFPGR προστέθηκε μίγμα αναστολέων πρωτεασών και φωσφατασών (1/100). Το σύνολο των πιο πάνω διαλυμάτων αποτελούσε το Lysis Buffer. Στη συνέχεια, τα μιτοχόνδρια ομογενοποιούνταν με το μηχάνημα υπερήχων 4 φορές για 20 δευτερόλεπτα. Το δείγμα διατηρούνταν στον πάγο κατά τη διαδικασία της λύσης για να μην αναπτυχθεί θερμότητα και καταστραφούν οι πρωτεΐνες. Στη συνέχεια, φυγοκεντρήθηκε για 30 min στα 12000 rpm. Στην συνέχεια, επώαστηκε το παραπάνω υπερκείμενο με κάποια ποσότητα σφαιριδίων αгарόζης –IgA, IgG για 1 h σε ανάδευση στους 4 °C για να αποκλειστεί η μη ειδική σύνδεση συστατικών του εκχυλίσματος των κυττάρων με τα σφαιρίδια. Έπειτα, φυγοκεντρήθηκαν για 5 min στα 5000 rpm στους 4 °C για την απομάκρυνση των μη ειδικών συνδέσεων. Το υπερκείμενο (υπερκείμενο που έχει υποστεί προ-καθαρισμό, pre-clearance) συλλέχθηκε και διαμοιράστηκε στα σφαιρίδια που έχουν προεπωαστεί με τα αντισώματα για 16 ώρες, στους 4°C, υπό ανάδευση.

Μετά την ολοκλήρωση 16ωρης επώασης επώασης του δείγματος σφαιριδίων - κατάλληλων αντισωμάτων και εκχυλίσματος μιτοχονδρίων, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 3000 rpm για 5 min στους 4 °C και φυλάχθηκε το υπερκείμενο στους -20 °C (Unbound). Ακολούθησε προσθήκη 1 ml RIPA στο ίζημα, ανάδευση 5 min στους 4 °C και φυγοκέντρωση στα 3500 rpm για 5 min στους 4 °C. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιήθηκε 4 φορές. Τέλος, έγινε προσθήκη 25 μl Sample Buffer 2X, vortex, θέρμανση στο heat blocker στους 95 °C και spin και συλλογή του υπερκειμένου σε νέο eppendorf. Μετά από μία επανάληψη του σταδίου αυτού, το υπερκείμενο αποθηκεύτηκε στους -20 °C.

### 3.2.7.2 2<sup>η</sup> μέθοδος

Αρχικά, παρασκευάστηκαν τα διαλύματα: 1 ml PBS 1X και 0,5 ml διαλύματος RIPA με τις αντίστοιχες ποσότητες των πρωτεολυτικών αναστολέων. Τα MITOs που χρησιμοποιήθηκαν επαναδιαλυτοποιήθηκαν με διάλυμα 90 μl RIPA με τελικό όγκο 140 μl (MITOs + RIPA). Τα σφαιρίδια που προετοιμάστηκαν ήταν 3, δεδομένου ότι τα δείγματα ήταν 3: control (IgG), δείγμα και preclearance. Σε κάθε δείγμα έπρεπε να προστεθούν 25 μl IgA και 25 μl IgG. Επειδή τα σφαιρίδια είναι διαλυμένα σε αιθανόλη, πρέπει να προστεθεί διπλάσιος όγκος (75 μl IgA και 75 μl IgG. Ακολούθησε ομογενοποίηση των MITOs με το μηχάνημα υπερήχων 4 φορές για 20 δευτερόλεπτα και φυγοκέντρωση των σφαιριδίων A/G στα 2000 rpm, στους 4 °C για 5min. Μετά την φυγοκέντρωση, γινόταν αφαίρεση του υπερκειμένου (αιθανόλη), προσθήκη 1 ml PBS 1X, 3 min ανάδευση στους 4 °C και ξανά φυγοκέντρωση στα 2000 rpm, στους 4 °C για 5min. Ο κύκλος αυτός έγινε 3 φορές και μετά την 3<sup>η</sup> φυγοκέντρωση, αφού έγινε αφαίρεση του υπερκειμένου και προσθήκη 1 ml PBS 1X, διαιρέθηκε η ποσότητα των σφαιριδίων στα 3: mIgG, 2F8-GR, prec. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 2000rpm στους 4 °C για 5min, αφαίρεση υπερκειμένου από το ένα δείγμα και τα άλλα δύο φυλλάχθηκαν στους -20 °C.

Επαναλήφθηκε η ομογενοποίηση των MITOs αφού προστέθηκαν σε αυτά 500 µl PBS και έπειτα φυγοκεντρήθηκαν για 30 min στα 13000 rpm στους 4°C. Σε eppendorf "MITOSOL" έγινε προσθήκη του υπερκείμενου, μεταφορά στο prec και ανάδευση για 1h στους 4 °C. Έπειτα, φυγοκεντρήθηκε στα 5000 rpm, στους 4 °C για 5min και το υπερκείμενο διαιρέθηκε στα 2: 2F8-GR και mIgG. Έγινε προσθήκη των αντίστοιχων αντισωμάτων και επώαστηκαν για 16 ώρες, στους 4°C, υπό ανάδευση.

Μετά τις 16 h, φυγοκεντρήθηκαν τα 2F8, IgG και τα αντίστοιχα σφαιρίδια αгарόζης τους στα 3000 rpm, στους 4 °C για 5min. Από τα 2 δείγματα σφαιριδίων, αφαιρέθηκε το υπερκείμενό τους και προστέθηκαν σε αυτά μιτοχονδριακά εκχυλίσματα που είχαν προεπωαστεί με τα αντισώματα 2F8-GR και mIgG αντίστοιχα με προσοχή για την αποφυγή αναταράξεων των σφαιριδίων. Ακολούθησε ανάδευση-επώαση για 3,5 h στους 4 °C. Έπειτα, ακολούθησε ένας κύκλος 5 εκπλύσεων με PBS 1X (στον πάγο) για να απαληφθεί το μη ειδικό σήμα, λόγω προσμίξεων. Αναλυτικότερα: φυγοκέντρωση στα 35000 rpm, στους 4 °C για 5min, αφαίρεση υπερκείμενου και πρόσθεση υπερκείμενου στα αντίστοιχα νέα eppendorfs: Unbound 2F8 και Unbound IgG.

Παράλληλα, προετοιμάστηκε το Sample Buffer: θέρμανση του stock SB 4X στο heat blocker στους 94 °C. Η τελική επιθυμητή ποσότητα ήταν 2X, οπότε έπρεπε να γίνει αραίωση 1:1. Σε ένα eppendorf προστέθηκαν: 100 µl SB 4X και 100 µl ddH<sub>2</sub>O. Από την τελευταία φυγοκέντρωση, αφού απομακρύνθηκε το υπερκείμενο, προστέθηκαν στο κάθε 2F8-GR και mIgG 25 µl SB 2X, θερμάνθηκαν στους 94 °C και φυγοκεντρήθηκαν στα 3000 rpm για 3 min σε θερμοκρασία δωματίου (RT). Προετοιμάστηκαν 2 eppendorfs: IP mIgG και IP 2F8-GR και μεταφέρθηκε σε αυτά το αντίστοιχο υπερκείμενο. Ξαναπροστέθηκαν 25 µl SB σε κάθε mIgG και 2F8-GR και ακολούθηθηκε η ίδια διαδικασία (θέρμανση-φυγοκέντρωση-προσθήκη υπερκείμενων στα αντίστοιχα IP mIgG και IP 2F8-GR). Τέλος, φυλάχθηκαν τα δείγματα στους -20 °C.

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στα δείγματα με τα μιτοχόνδρια των κυττάρων, πραγματοποιήθηκε η μέθοδος Bradford.

### **3.2.8 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνών σε διάλυμα (μέθοδος Bradford)**

Η εύρεση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών που περιέχονται σε ένα διάλυμα γίνεται εύκολα με χρωματομετρικές μεθόδους, ή με τη μέτρηση της οπτικής απορρόφησης των δειγμάτων σε μήκος κύματος 280 nm. Οι μέθοδοι Bradford και Lowry χρησιμοποιούνται πιο συχνά για τον υπολογισμό μικρομοριακών ποσοτήτων πρωτεϊνών. Τα τελευταία χρόνια ως μέθοδος εκλογής χρησιμοποιείται η μέθοδος Bradford, λόγω της ευκολίας και της ταχύτητας με την οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί. Η μέθοδος αυτή εξαρτάται από τη δέσμευση της χρωστικής Coomassie G-250, κυρίως στα βασικά αμινοξέα των πρωτεϊνών, αλλάζοντας



ταυτόχρονα το μήκος κύματος της μέγιστης απορρόφησης τους. Αυτό οδηγεί σε μια φασματική μετατόπιση από την κοκκινωπή / καφέ μορφή της χρωστικής ουσίας (μέγιστη απορρόφηση στα 465 nm) στη μπλε μορφή της χρωστικής (μέγιστη απορρόφηση στα 610 nm). Η διαφορά απορρόφησης μεταξύ των δύο μορφών της χρωστικής είναι μεγαλύτερη στα 595 nm, κι έτσι αυτό είναι το βέλτιστο μήκος κύματος για τη μέτρηση του μπλε χρώματος από το σύμπλοκο της χρωστικής με την πρωτεΐνη. Η δέσμευση αυτή είναι ανάλογη του ποσού των πρωτεϊνών (Bradford 1976). Με τη μέθοδο Bradford μπορεί να μετρηθεί συγκέντρωση πρωτεϊνών από 1-100 µg. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης αγνώστου δείγματος χρησιμοποιείται πρότυπη καμπύλη, η οποία κατασκευάζεται με τη βοήθεια γνωστών συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης αλβουμίνης ορού βοός (BSA). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η πρότυπη πρωτεΐνη διαλύεται σε ίδιας σύστασης ρυθμιστικό διάλυμα, στο οποίο είναι διαλυμένες οι άγνωστες πρωτεΐνες.

Το αντιδραστήριο Bradford που χρησιμοποιήθηκε είναι εμπορικά διαθέσιμο σε συγκέντρωση 5X. Αρχικά, σε έναν σωλήνα προστέθηκε 4 V µl H<sub>2</sub>O και 1 V µl διαλύματος Bradford 5X. Ο σωλήνας, το διάλυμα του οποίου ήταν κεραμιδί, τυλίχτηκε με αλουμινόχαρτο και τοποθετήθηκε στο σκοτάδι. Σε ένα άλλο eppendorf προστέθηκε 1 ml του διαλύματος Bradford 1X και 1 µl του δείγματός μας, "load", στην άκρη του τοιχώματός του. Ακολούθησε γρήγορο vortex και φύλαξη στο σκοτάδι για 25 min. Επίσης, παρασκευάστηκε ένα "τυφλό" δείγμα, το οποίο περιείχε 1 µl διαλύματος λύσης των μιτοχονδρίων και 1 ml διαλύματος Bradford 1X και φυλάχτηκε στο σκοτάδι μαζί με το "load". Μετά από 25 min ακολούθησε μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στο φασματοφωτόμετρο στα 595 nm. Η εξίσωση για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στο δείγμα που χρησιμοποιήθηκε είναι:  $y = 0,0345x + 0,010$  όπου y: Απορρόφηση και x: µg πρωτεΐνης/µl δείγμα. Τα δύο δείγματα που μετρήθηκαν ήταν: M unbound και MITOSOL από την 1<sup>η</sup> και 2<sup>η</sup> ανοσοκατακρήμνιση αντίστοιχα.

### **3.2.9 Διαχωρισμός πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS page)**

Τα δείγματα της ανοσοκατακρήμνισης, υπέστη ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό την επίδραση ενός αποδιατακτικού παράγοντα, του SDS. Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί το φαινόμενο όπου ένα μόριο με καθαρό φορτίο θα μετακινηθεί σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Η ταχύτητα μετακίνησης της πρωτεΐνης σε ένα ηλεκτρικό πεδίο εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης και τον συντελεστή τριβής. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται πάντα σε πηκτή (ή άλλο σταθερό υπόβαθρο, όπως χαρτί) διότι η πηκτή λειτουργεί ως μοριακός ηθμός που ενισχύει το διαχωρισμό. Τα μόρια που είναι μικρά σε σχέση με τους πόρους της πηκτής μετακινούνται εύκολα διαμέσου της πηκτής, ενώ τα μεγάλα μόρια μένουν σχεδόν αμετακίνητα. Μόρια ενδιάμεσου μεγέθους μετακινούνται μέσα από την πηκτή με διαφορετικές ταχύτητες. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται μέσα σε μια λεπτή

κατακόρυφη πλάκα πολυακρυλαμιδίου. Η κατεύθυνση ροής είναι από πάνω προς τα κάτω. Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου προτιμάται διότι είναι ένα υλικό χημικά ουδέτερο και η παρασκευή της πηκτής είναι εύκολη.

Οι πρωτεΐνες είναι δυνατόν να διαχωριστούν κυρίως βάσει της μάζας τους. Το μίγμα των πρωτεϊνών διαλύεται πρώτα σε διάλυμα δωδεκακυλο-θειικού νατρίου (SDS), ενός ανιοντικού απορρυπαντικού που καταστρέφει σχεδόν όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μιας φυσικής πρωτεΐνης. Προστίθεται επίσης μερκαπτοαιθανόλη, που ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς. Τα ανιόντα SDS δεσμεύονται στις κύριες αλυσίδες σε αναλογία ένα μόριο ανά 2 αμινοξέα, δίνοντας στο σύμπλοκο ισχυρό φορτίο, περίπου ανάλογο της μάζας της πρωτεΐνης. Το αρνητικό φορτίο που αποκτάται με την δέσμευση του SDS είναι συνήθως πολύ μεγαλύτερο από ότι το αρχικό φορτίο της φυσικής πρωτεΐνης, επομένως το αρχικό φορτίο καθίσταται αμελητέο. Τα σύμπλοκα SDS-αποδιαταγμένης πρωτεΐνης ηλεκτροφορούνται σε πολυακρυλαμίδιο. Οι μικρές πρωτεΐνες μετακινούνται εύκολα διαμέσου της πηκτής, ενώ οι μεγάλες μένουν στην κορυφή κοντά στο σημείο τοποθέτησης του δείγματος. Στο τέλος, οι πρωτεΐνες στην πηκτή εμφανίζονται με χρώση με άργυρο (SILVER staining) ή με κυανούν του Coomasie (Berg M et al, Biochemistry 5<sup>th</sup> edition).

Στις περισσότερες περιπτώσεις, η ηλεκτροφόρηση είναι ασυνεχής (discontinuous) επιτελείται δηλαδή σε δύο διαδοχικά πηκτώματα: ένα πήκτωμα επιστοίβασης (stacking gel) στο οποίο τοποθετούνται τα δείγματα και ένα πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel) το οποίο ακολουθεί ακριβώς κάτω από το πήκτωμα επιστοίβασης. Το πήκτωμα επιστοίβασης έχει μικρότερη περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδιο, ενώ το πήκτωμα διαχωρισμού είναι πιο πυκνό. Εκτός από τη διαφορά στη συγκέντρωση ακρυλαμιδίου, οι δύο τύποι πηκτής διαφέρουν και στην τιμή του pH: το πήκτωμα επιστοίβασης έχει pH περίπου 6,8, κοντά στο pH που έχουν και οι πρωτεΐνες.

#### *Πρακτικό μέρος*

Αρχικά, παρασκευάστηκε το separating gel, το οποίο η συγκέντρωση του ακρυλαμιδίου εξαρτάται από τον βαθμό διαχωρισμού που επιθυμείτε. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, παρασκευάστηκε separating gel με συγκέντρωση ακρυλαμιδίου 10% σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 4. Αντιδραστήρια και οι όγκοι τους για την παρασκευή της πηκτής διαχωρισμού.**

Αντιδραστήρια	Τελικοί όγκοι
Ακρυλαμίδιο 10%	1,25 μl
Tris-HCl 1,5M (pH8,8)	1,25 μl
SDS 10%	50 μl

TEMED	2,5 $\mu$ l
APS 10%	25 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	2,425 ml

Τα αντιδραστήρια Tris-HCl, Ακρυλαμίδιο, Temed φυλάσσονται στους 4 °C, Το APS φυλάσσεται στους -20 °C. Το APS (Ammonium Persulfate: υπερθειϊκό αμμώνιο-απαρχητής του πολυμερισμού) και το TEMED (N, N,-τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη-επιταχυντής του πολυμερισμού) προστίθενται στο τέλος καθώς είναι υπεύθυνα για την επιτάχυνση του πολυμερισμού του ακρυλαμιδίου. Το APS δημιουργεί ελεύθερες ρίζες για πολυμερισμό ενώ ο επιταχυντής καταλύει τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου.

Στην συνέχεια, παρασκευάστηκε το stacking gel, το οποίο έχει σταθερή συγκέντρωση ακρυλαμίδης 4%. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα παρακάτω:

**Πίνακας 5. Αντιδραστήρια και οι όγκοι τους για την παρασκευή του stacking gel.**

Αντιδραστήρια	Τελικοί όγκοι
Ακρυλαμίδιο 4%	0,25 ml
Tris-HCl (pH6,8)	0,21 ml
SDS 10%	25 $\mu$ l
TEMED	2,5 $\mu$ l
APS 10%	12,5 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	2,025 ml

Προετοιμασία δείγματος ηλεκτροφόρησης.

Τα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση ήταν ήδη έτοιμα για φόρτωση καθώς περιείχαν 2X SDS SAMPLE BUFFER. Το SB περιέχει: 1M Tris pH 6.8, 10% glycerol, 10% SDS, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη, 1% bromophenol blue (έγχρωμος δείκτης). Πριν γίνει η φόρτωση, τα δείγματα θερμάνθηκαν στους 95°C για 3 λεπτά έτσι ώστε να γίνεται μετουσίωση των πρωτεϊνών (αποδιάταξη). Μετά την θέρμανση ακολούθησε spin για να μην χαθεί ποσότητα πρωτεΐνης λόγω δημιουργίας υδρατμών.

Συναρμολογείται η συσκευή ηλεκτροφόρησης και φορτώνονται 30-50 $\mu$ g πρωτεΐνης στις ειδικές αύλακες της πηκτής (wells) καθώς και οι έγχρωμοι μάρτυρες μοριακού βάρους (marker). Τα δείγματα που φορτώθηκαν και η σειρά φόρτωσής τους φαίνεται στον Πίνακα 4-5.

**Πίνακας 6. Σειρά φόρτωσης δειγμάτων από την 1η ανοσοκατακρήμνιση.**

# well	1	2	3	4	5
sample	marker	2F8-GR	2F8-GR	mIgG	mIgG

**Πίνακας 7. Σειρά φόρτωσης δειγμάτων από την 2η ανοσοκατακρήμνιση.**

# well	1	2	3	4	5	6	7	8
sample	marker	-	2F8-GR	2F8-GR	-	mIgG	mIgG	mIgG

Προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer) και έρχεται σε επαφή με την πηκτή. Η σύσταση του running buffer για 10X gel είναι η εξής: 30 g Tris-Base, 188 g glycine, 100 ml 10% SDS και H<sub>2</sub>O έως το 1 L. Τέλος, συνδέθηκαν τα ηλεκτρόδια με την συσκευή τροφοδότησης ρεύματος και εφαρμόστηκε ρεύμα έντασης 0,02 Amber περίπου 100 V. Κατά την πορεία της ηλεκτροφόρησης παρατηρείται: τα ανιόντα γλυκίνης (pH:8.3-8.8) κινούνται μέσα στο δείγμα και στην πηκτή συσώρευσης (stacking gel). Συναντούν το ρυθμιστικό Tris-HCl pH: 6.8 και τιτλοδοτούνται σε pH: 6.9 με αποτέλεσμα να μειώνεται το φορτίο και η κινητικότητά τους. Οι πρωτεΐνες σε pH: 6.8 έχουν μεγάλο αρνητικό φορτίο, υπερπηδούν τις δυνάμεις τριβής και κινούνται πιο γρήγορα από τα ιόντα γλυκίνης και συσσωρεύονται σε στενές ζώνες μεγάλης συγκέντρωσης. Καθώς οι πρωτεΐνες περνάνε στην πηκτή διαχωρισμού (separating gel) τιτλοδοτούνται σε pH:8.8 και υφίστανται βραδυπορεία λόγω της υψηλής συγκέντρωσης ακρυλαμίδιου.

### **3.2.10 Silver Staining για 2D gels συμβατό με φασματοφωτομετρία μάζας (Mass Spectrometry)**

Το silver staining είναι μια μέθοδος ανίχνευσης πρωτεϊνών που έπεται της ηλεκτροφόρησης πηκτών ακρυλαμίδιου και χαρακτηρίζεται από την υψηλή ευαισθησία της, τα φθηνά αναλώσιμα και την ευκολία της εφαρμογής της. Η λογική του silver staining είναι απλή. Οι πρωτεΐνες δεσμεύουν ιόντα αργύρου, τα οποία μπορούν να μειωθούν σε αριθμό υπό κατάλληλες συνθήκες με σκοπό την δημιουργία εμφανής εικόνας από τον άργυρο. Όλα τα πρωτόκολλα αποτελούνται από τα ίδια βασικά στάδια, τα οποία είναι: i) φιξάρισμα του gel για την απαλλαγή παρεμβαλλόμενων μορίων ii) ευαισθητοποίηση και ξέπλυμα για αύξηση της ευαισθησίας και του κοντραστ iii) εμποτισμό με άργυρο είτε με την μορφή νιτρικού αργύρου είτε με διάλυμα νιτρικής αμμωνίας iv) ξέπλυμα και ανάπτυξη για την δημιουργία εικόνας αργύρου και v) λήξη και ξέπλυμα για τον τερματισμό της ανάπτυξης πριν τον υπέρμετρο σχηματισμό background και για την απομάκρυνση ιόντων αργύρου και άλλων χημικών (Chevallet M. et al, 2006).

### Πρακτικό Μέρος

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε έχει δημοσιευθεί από τους Shenchenko et al., Anal. Chem 1996, 68, 850-858.

Πριν την έναρξη της διαχείρισης του gel, παρασκευάστηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

1. "fix": 50% Methanol, 5% Acetic Acid σε τελικό όγκο 200 ml. Οπότε, αναμίχθηκαν 100 ml Methanol + 10 ml acetic acid + 90 ml ddH<sub>2</sub>O
2. "wash": 50% Methanol: 100 ml Methanol + 100 ml ddH<sub>2</sub>O
3. "wash": 100% MilliQ H<sub>2</sub>O: 200ml ddH<sub>2</sub>O
4. "wash": 5 µg/ml DTT φρέσκο
5. "sensitize": 0,02% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 0,04 g Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> σε 200 ml ddH<sub>2</sub>O φρέσκο
6. "wash x2": 100% MilliQ H<sub>2</sub>O: 200ml ddH<sub>2</sub>O
7. "stain": **Cold** 0,1% AgNO<sub>3</sub>: 0,2 g AgNO<sub>3</sub> σε 200 ml ddH<sub>2</sub>O φρέσκο
8. "wash x2": 100% MilliQ H<sub>2</sub>O: 200ml ddH<sub>2</sub>O
9. "develop": 0,04% formalin, 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: 4 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 80 µl formalin + 200ml ddH<sub>2</sub>O φρέσκο
10. "stop": 5% HAc: 10 ml acetic acid + 190 ml ddH<sub>2</sub>O
11. "store": 1% Acetic Acid: 2 ml acetic acid + 198 ml ddH<sub>2</sub>O

### Διαδικασία χρώσης

- 1) Μετά την ηλεκτροφόρηση, έγινε φιξάρισμα της πηκτής για 20 min σε RT χρησιμοποιώντας το fixation διάλυμα (1.)
- 2) Πλύση του gel με το washing διάλυμα (2.) 2 φορές των 5 min.
- 3) Πλύση του gel για 10 min με το (3.) 3 φορές
- 4) Πλύση του gel με το (4.) για 30 sec.
- 5) Ευαισθητοποίηση του gel με επώαση 1 min στο (5.). Στα 20 sec πριν την λήξη του 1 min, έγινε απόχυση του διαλύματος.
- 6) Ξέπλυμα του gel 2 φορές με (8.) για 1 min. Στα 50 sec γινόταν απόχυση.
- 7) Βύθιση του gel σε κρύο 0,1 % διάλυμα νιτρικού αργύρου (7.) και ανάδευση για 20 min στους 4 °C στο σκοτάδι και καλλυμένο με αλουμινόχαρτο.
- 8) Απόχυση του νιτρικού αργύρου και ξέπλυμα του gel με το (8.) για 1 min κάθε φορά.
- 9) Ανάπτυξη του gel χρησιμοποιώντας το (9.) με γρήγορη ανάδευση. Μόλις το διάλυμα έπαιρνε κίτρινο χρώμα, ανανεωνόταν με καινούριο μέχρι την απόκτηση της επιθυμητής εικόνας. Το διάλυμα αυτό ετοιμάστηκε τελευταία στιγμή.
- 10) Τερματισμός της χρώσης με απόχυση του διαλύματος ανάπτυξης και αντικατάστασής του με το (10.).
- 11) Φύλαξη του gel σε 1% οξικό οξύ (11.) μέχρι την ημέρα ανάλυσής του.

### 3.2.11 Προσδιορισμός πρωτεϊνών με την μέθοδο της φασματοφωτομετρίας μάζας (mass spectrometry)

Το gel της προηγούμενης πειραματικής διαδικασίας υποβλήθηκε σε προσδιορισμό της σύστασης των πρωτεϊνών του με την μέθοδο της φασματομετρίας μάζας από το Ερευνητικό Κέντρο Βιοιατρικών Επιστημών 'Αλεξάντερ Φλέμινγκ'.

Η MS είναι μια αναλυτική χημική τεχνική που αποσκοπεί στον προσδιορισμό της ποσότητας και του τύπου των χημικών ουσιών που υπάρχουν σε ένα δείγμα με τη μέτρηση του λόγου μάζας προς φορτίο ( $m/z$ ) και την αφθονία των ιόντων αερίου φάσεως. Σε μία τυπική διαδικασία MS, ένα δείγμα, το οποίο μπορεί να είναι στερεό, υγρό ή αέριο, ιονίζεται, για παράδειγμα με βομβαρδισμό με ηλεκτρόνια. Αυτό μπορεί να προκαλέσει μερικά από τα μόρια του δείγματος να σπάσουν σε φορτισμένα τμήματα (fragments). Αυτά τα ιόντα κατόπιν διαχωρίζονται ανάλογα με τον λόγο μάζας προς φορτίο μέσω επιτάχυνσής τους και υποβολή τους σε ένα ηλεκτρικό ή μαγνητικό πεδίο: ιόντα του ίδιου λόγου μάζας προς φορτίο, θα υποστούν την ίδια ποσότητα εκτροπής. Τα ιόντα ανιχνεύονται με ένα μηχανισμό ικανό να ανιχνεύει φορτισμένα σωματίδια, όπως ένας πολλαπλασιαστής ηλεκτρονίων (Sparkman, O. David, 2000). Το διάγραμμα της έντασης του μετρούμενου ρεύματος (σε σχετικές και όχι απόλυτες μονάδες) σε συνάρτηση με το λόγο  $m/z$  ονομάζεται φάσμα μαζών (mass spectrum) της ουσίας. Επειδή τα ιόντα που παράγονται φέρουν κατά κανόνα ένα φορτίο ο λόγος  $m/z$  αντιστοιχεί αριθμητικά με το μοριακό βάρος του ιόντος. Τα άτομα ή τα μόρια του δείγματος μπορούν να ταυτοποιηθούν με γνωστές συσχετίζοντας μάζες για τις προσδιοριζόμενες μάζες ή μέσω χαρακτηριστικό πρότυπο κατακερματισμού μετά από ενζυμική πέψη με πρωτεάσες όπως θρυψίνη και πεψίνη (peptide mass fingerprinting).

### **3.2.12 Ανάλυση αποτελεσμάτων MS με την μέθοδο Label-free quantification**

Η ανάλυση των πρωτεϊνών όλων των δειγμάτων που προήλθαν από την φασματοσκοπία μάζας πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο Label-Free Quantification (LFQ). Η LFQ είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρύτατα στην φασματοσκοπία μάζας με στόχο τον καθορισμό της σχετικής ποσότητας των πρωτεϊνών σε δύο ή περισσότερα βιολογικά δείγματα. Σε αντίθεση με άλλες μεθόδους ποσοτικοποίησης, η LFQ δεν περιλαμβάνει τη χρήση ισοτόπου για τη δημιουργία χημικού δεσμού και επισήμανσης (label) με την πρωτεΐνη. Πλέον, ακολουθούνται δύο διαφορετικές στρατηγικές LFQ για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών. Η πρώτη μετράει και συγκρίνει την ένταση των σημάτων από την MS των πεπτιδικών ιόντων που αντιστοιχούν σε μία πρωτεΐνη και η δεύτερη μετράει και συγκρίνει τον αριθμό των φασμάτων που αντιστοιχούν σε πεπτιδικά θραύσματα μίας πρωτεΐνης. Η LFQ επιλέγεται για την ποσοτικοποίηση πρωτεϊνικών δειγμάτων σε σχέση με τις label quantification μεθόδους λόγω ποικίλων πλεονεκτημάτων, κάποια από τα οποία είναι η εξοικονόμηση χρόνου και κόστους από τη μη χρήση ετικετών καθώς και από την δυνατότητα σύγκρισης απεριόριστου αριθμού δειγμάτων (Bantscheff Marcus et al., 2007).

### 3.2.13 DAVID Gene Functional Classification Tool

Λόγω της εκτενής λίστας γονιδιακών δεδομένων από την τελευταία ανάλυση (LFQ), χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα DAVID Gene Functional Classification Tool. Το συγκεκριμένο πρόγραμμα χρησιμοποιεί έναν καινούριο αλγόριθμο συσσώρευσης για να συμπυκνώσει μία λίστα γονιδίων ή συσχετιζόμενων βιολογικών μορίων-όρων, σε οργανωμένες τάξεις συγγενικών γονιδίων ή λειτουργιών, που ονομάζονται βιολογικές ενότητες (biological modules). Αυτή η οργάνωση επιτυγχάνεται με μείωση της συν-εμφάνισης των λειτουργικών συμπλόκων που συναντώνται σε ποικίλες πηγές λειτουργικών αναφορών (functional annotation). Είναι μία υπέρμετρη μέθοδος ομαδοποίησης λειτουργικά συγγενικών γονιδίων, όπου μέσω διατηρήσιμων ενοτήτων είναι δυνατόν η αποδοτική ερμηνεία εκτενών γονιδιακών λιστών (Huang D. W., Sherman B. T., Tan Q., Collins J. R., Alvord G. R., Roayaei J., Stephens R., Baseler M. W., Lane C. H., Lempicki R. A., The DAVID Gene Functional Classification Tool: a novel biological module-centric algorithm to functionally analyze large gene lists, Genome Biol. 2007; 8(9): R183).

## 4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1 Αποτελέσματα μεθόδου Bradford

Η μέτρηση της απορρόφησης των 2 δειγμάτων αναγράφεται στον Πίνακα 8.:

**Πίνακας 8. Τιμές οπτικής πυκνότητας πρωτεϊνικών δειγμάτων.**

Δείγμα	Απορρόφηση (595 nm)
M unbound	0,055
MITOSOL	0,046

Με τη χρήση της εξίσωσης  $y = 0,0345x + 0,010$  μπορεί να υπολογιστεί η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε κάθε εξεταζόμενο δείγμα (σε  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Επομένως, για το **M unbound** είναι:  $y = 0,0345x + 0,010 \Leftrightarrow 0,055 = 0,0345x + 0,010 \Leftrightarrow x = \frac{0,055-0,010}{0,0345} \Leftrightarrow x = 1,304 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

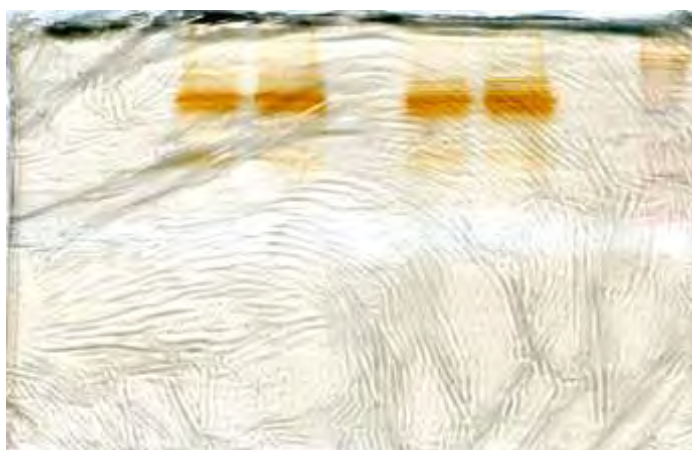
**MITOSOL:**  $y = 0,0345x + 0,010 \Leftrightarrow 0,046 = 0,0345x + 0,010 \Leftrightarrow x = \frac{0,046-0,010}{0,0345} \Leftrightarrow x = 1,043 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ .



## 4.2 Αποτελέσματα από την διαδικασία ανίχνευσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Silver staining

### 4.2.1 Αποτελέσματα χρώσης πηκτής με τη μέθοδο Silver staining του 1<sup>ου</sup> πειράματος

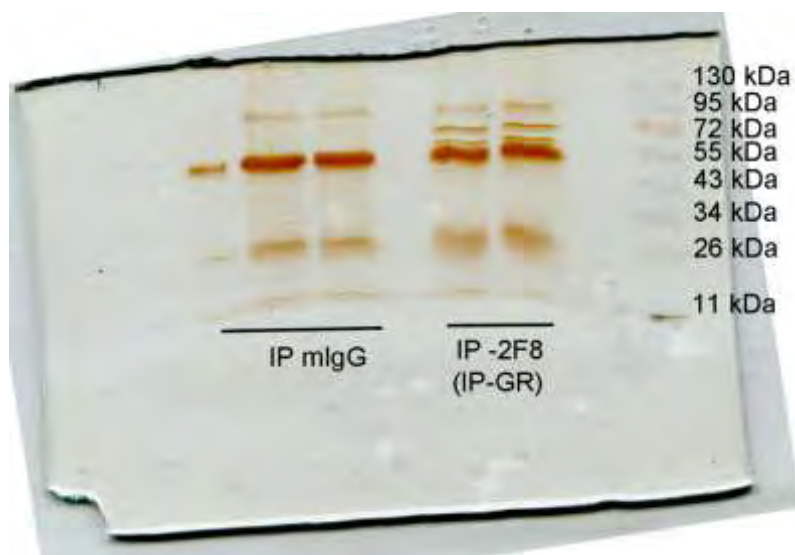
Μετά το πέρας της διαδικασίας χρώσης της πηκτής με την μέθοδο Silver staining, προέκυψε η παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 17. Απεικόνιση των ανιχνευμένων πρωτεϊνών του 1ου πειράματος με τη μέθοδο Silver staining.

### 4.2.2 Αποτελέσματα χρώσης πηκτής με τη μέθοδο Silver staining του 2<sup>ου</sup> πειράματος

Η παρακάτω εικόνα αντιπροσωπεύει τα αποτελέσματα της ανίχνευσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Silver staining του 2<sup>ου</sup> πειράματος.



Εικόνα 18. Απεικόνιση των ανιχνευμένων πρωτεϊνών του 1ου πειράματος με τη μέθοδο Silver staining. Σημειώνονται τα M.B. του δείκτη που χρησιμοποιήθηκε καθώς και η σειρά φόρτωσης των δειγμάτων της 2<sup>ης</sup> ανοσοκατακρήμνισης, IP mIgG και IP 2F8-GR.

### 4.3 Αποτελέσματα της ανάλυσης με φασματογράφο μάζας (Mass spectrometry, MS)

#### 4.3.1 Αποτελέσματα MS ανάλυσης από το 1<sup>ο</sup> πείραμα

Τα αποτελέσματα από την διεξαγωγή της MS ανάλυσης για τα δείγματα των δύο πειραμάτων αναγράφονται στους παρακάτω Πίνακες.

##### 4.3.1.1 Όλα τα μόρια που προσδιορίστηκαν στο σύμπλοκο ανοσοκατακρήμνισης των δειγμάτων mIgG και 2F8-GR

Τα αποτελέσματα από την διεξαγωγή της MS ανάλυσης για το πρώτο πείραμα παρατίθενται στους παρακάτω Πίνακες 9 έως 11. Στον Πίνακα 9 αναγράφονται τα μόρια που ανιχνεύθηκαν στο δείγμα 2F8-GR και στον Πίνακα 10 αναγράφονται τα μόρια του mIgG.

**Πίνακας 9. Μόρια που ανιχνεύθηκαν στο σύμπλοκο ανοσοκατακρήμνισης του δείγματος 2F8-GR της 1ης ανοσοκατακρήμνισης.**

Μόρια που ανιχνεύθηκαν στο δείγμα 2F8-GR
Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6 - [K2C1_HUMAN]
Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6 - [K1C10_HUMAN]
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2 - [K22E_HUMAN]
Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3 - [K1C9_HUMAN]
Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=4 - [K1C14_HUMAN]
Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT5 PE=1 SV=3 - [K2C5_HUMAN]
Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Homo sapiens GN=KRT6A PE=1 SV=3 - [K2C6A_HUMAN]
Keratin, type I cytoskeletal 16 OS=Homo sapiens GN=KRT16 PE=1 SV=4 - [K1C16_HUMAN]
60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPD1 PE=1 SV=2 - [CH60_HUMAN]
78 kDa glucose-regulated protein OS=Homo sapiens GN=HSPA5 PE=1 SV=2 - [GRP78_HUMAN]
Keratin, type II cytoskeletal 3 OS=Homo sapiens GN=KRT3 PE=1 SV=3 - [K2C3_HUMAN]
Stress-70 protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPA9 PE=1 SV=2 - [GRP75_HUMAN]
Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1 - [ACTB_HUMAN]
Keratin, type I cytoskeletal 13 OS=Homo sapiens GN=KRT13 PE=3 SV=1 - [K7ERE3_HUMAN]
Dermcidin OS=Homo sapiens GN=DCD PE=1 SV=2 - [DCD_HUMAN]
Isoform Alpha of Glucocorticoid receptor OS=Homo sapiens GN=NR3C1 - [GCR_HUMAN]
Actin-like protein 7A OS=Homo sapiens GN=ACTL7A PE=1 SV=1 - [ACL7A_HUMAN]
Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2 - [ALBU_HUMAN]
Elongation factor 1-alpha 1 OS=Homo sapiens GN=EEF1A1 PE=1 SV=1 - [EF1A1_HUMAN]
Isoform 2 of Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PDHB - [ODPB_HUMAN]
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5A1 PE=1 SV=1 - [ATPA_HUMAN]
Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HADHA PE=1 SV=2 - [ECHA_HUMAN]
Leucine-rich repeat neuronal protein 4 OS=Homo sapiens GN=LRRN4 PE=1 SV=3 - [LRRN4_HUMAN]

Isoform Short of Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 4 OS=Homo sapiens GN=ACSL4 - [ACSL4_HUMAN]
Isoform 2 of Adipocyte plasma membrane-associated protein OS=Homo sapiens GN=APMAP - [APMAP_HUMAN]
Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial (Fragment) OS=Homo sapiens GN=DLAT PE=3 SV=1 - [H0YDD4_HUMAN]
Serpin H1 OS=Homo sapiens GN=SERPINH1 PE=1 SV=2 - [SERPH_HUMAN]
Protein disulfide-isomerase A6 OS=Homo sapiens GN=PDIA6 PE=2 SV=1 - [B7Z254_HUMAN]
Trypsin-1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PRSS1 PE=3 SV=1 - [H0Y8D1_HUMAN]
Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=TRAP1 PE=2 SV=1 - [F5H897_HUMAN]
Endoplasmic reticulum protein OS=Homo sapiens GN=HSP90B1 PE=1 SV=1 - [ENPL_HUMAN]
NADPH-cytochrome P450 reductase OS=Homo sapiens GN=POR PE=1 SV=2 - [NCPR_HUMAN]
3-ketoacyl-CoA thiolase OS=Homo sapiens GN=HADHB PE=2 SV=1 - [B4E2W0_HUMAN]
ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Homo sapiens GN=ATP5B PE=3 SV=1 - [H0YH81_HUMAN]
Isoform 3 of Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PDHA1 - [ODPA_HUMAN]
Isoform Short of Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase OS=Homo sapiens GN=ALDH18A1 - [P5CS_HUMAN]
Calnexin OS=Homo sapiens GN=CANX PE=1 SV=2 - [CALX_HUMAN]
Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 3 OS=Homo sapiens GN=ACSL3 PE=1 SV=3 - [ACSL3_HUMAN]
Probable serine carboxypeptidase CPVL OS=Homo sapiens GN=CPVL PE=1 SV=2 - [CPVL_HUMAN]
Peroxisomal multifunctional enzyme type 2 OS=Homo sapiens GN=HSD17B4 PE=1 SV=3 - [DHB4_HUMAN]
Tubulin alpha-1A chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1A PE=2 SV=1 - [G3V1U9_HUMAN]
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1 OS=Homo sapiens GN=RPN1 PE=1 SV=1 - [RPN1_HUMAN]
Protein S100-A9 OS=Homo sapiens GN=S100A9 PE=1 SV=1 - [S10A9_HUMAN]
Transgelin-2 OS=Homo sapiens GN=TAGLN2 PE=1 SV=3 - [TAGL2_HUMAN]
Tubulin beta chain OS=Homo sapiens GN=TUBB PE=3 SV=1 - [F8VUJ7_HUMAN]
Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1 OS=Homo sapiens GN=ACSL1 PE=2 SV=1 - [D6RER0_HUMAN]
Putative golgin subfamily A member 6-like protein 7 OS=Homo sapiens PE=5 SV=1 - [GG6L7_HUMAN]
KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 4 OS=Homo sapiens GN=KANK4 PE=2 SV=1 - [KANK4_HUMAN]
Vesicular integral-membrane protein VIP36 OS=Homo sapiens GN=LMAN2 PE=1 SV=1 - [LMAN2_HUMAN]
Sodium-driven chloride bicarbonate exchanger OS=Homo sapiens GN=SLC4A10 PE=2 SV=1 - [B7Z2J0_HUMAN]
Prenylcysteine oxidase 1 OS=Homo sapiens GN=PCYOX1 PE=2 SV=1 - [B7Z3Y2_HUMAN]
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit OS=Homo sapiens GN=DDOST PE=2 SV=1 - [E7EWT1_HUMAN]
Isoform 2 of Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens GN=ASAP2 - [ASAP2_HUMAN]
Isoform 3 of Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 OS=Homo sapiens GN=ATP1A1 - [AT1A1_HUMAN]

Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate OS=Homo sapiens GN=MARCKS PE=1 SV=4 - [MARCKS_HUMAN]
Histone H4 OS=Homo sapiens GN=HIST1H4A PE=1 SV=2 - [H4_HUMAN]
Hornerin OS=Homo sapiens GN=HRNR PE=1 SV=2 - [HORN_HUMAN]
Ig gamma-2 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG2 PE=1 SV=2 - [IGHG2_HUMAN]
Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=LRPPRC PE=1 SV=3 - [LRPPRC_HUMAN]
Short/branched chain-specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ACADSB PE=2 SV=1 - [B4DQ51_HUMAN]
Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=SUCLA2 PE=3 SV=1 - [F5GXC8_HUMAN]
4F2 cell-surface antigen heavy chain (Fragment) OS=Homo sapiens GN=SLC3A2 PE=2 SV=1 - [F5H867_HUMAN]
LVV-hemorphin-7 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=HBB PE=2 SV=1 - [F8W6P5_HUMAN]
Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=UQCRC2 PE=4 SV=1 - [H3BSJ9_HUMAN]
Fatty aldehyde dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=ALDH3A2 PE=3 SV=1 - [J3QRD1_HUMAN]
Isoform 2 of Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2 OS=Homo sapiens GN=ARNT2 - [ARNT2_HUMAN]
Basal cell adhesion molecule OS=Homo sapiens GN=BCAM PE=1 SV=2 - [BCAM_HUMAN]
ATPase family AAA domain-containing protein 3B OS=Homo sapiens GN=ATAD3B PE=2 SV=2 - [A6NFL3_HUMAN]
Hypoxia up-regulated protein 1 OS=Homo sapiens GN=HYOU1 PE=2 SV=1 - [B7Z909_HUMAN]
Lysozyme C OS=Homo sapiens GN=LYZ PE=2 SV=1 - [F8VV32_HUMAN]
Lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein (Fragment) OS=Homo sapiens GN=LRBA PE=4 SV=1 - [H0YAC6_HUMAN]
Isoform 3 of Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1 OS=Homo sapiens GN=P4HA1 - [P4HA1_HUMAN]
Isoform 2 of Uncharacterized protein KIAA0825 OS=Homo sapiens GN=KIAA0825 - [K0825_HUMAN]

**Πίνακας 10. Μόρια που ανιχνεύθηκαν στο σύμπλοκο ανοσοκατακρήμνισης του δείγματος mIgG της 1ης ανοσοκατακρήμνισης.**

Μόρια που ανιχνεύθηκαν στο δείγμα mIgG (control)
Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6 - [K2C1_HUMAN]
Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6 - [K1C10_HUMAN]
Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3 - [K1C9_HUMAN]
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2 - [K22E_HUMAN]
Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=4 - [K1C14_HUMAN]
Keratin, type I cytoskeletal 16 OS=Homo sapiens GN=KRT16 PE=1 SV=4 - [K1C16_HUMAN]
Keratin, type II cytoskeletal 6B OS=Homo sapiens GN=KRT6B PE=1 SV=5 - [K2C6B_HUMAN]
Structural maintenance of chromosomes protein 6 OS=Homo sapiens GN=SMC6 PE=1 SV=2 - [SMC6_HUMAN]
Keratin 6C OS=Homo sapiens GN=KRT6C PE=3 SV=2 - [E7EQV7_HUMAN]
Keratin, type I cytoskeletal 17 OS=Homo sapiens GN=KRT17 PE=1 SV=2 - [K1C17_HUMAN]
Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT5 PE=1 SV=3 - [K2C5_HUMAN]
Isoform 3 of Keratin, type I cytoskeletal 13 OS=Homo sapiens GN=KRT13 - [K1C13_HUMAN]

Keratin, type I cytoskeletal 19 OS=Homo sapiens GN=KRT19 PE=1 SV=4 - [K1C19_HUMAN]
SLAIN motif family, member 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=SLAIN1 PE=4 SV=1 - [C9JP03_HUMAN]
Keratin 18 OS=Homo sapiens GN=KRT18 PE=3 SV=1 - [F8VZY9_HUMAN]
Caspase 12 (gene/pseudogene) OS=Homo sapiens GN=CASP12 PE=3 SV=1 - [D6RFK8_HUMAN]
Keratin, type II cytoskeletal 8 OS=Homo sapiens GN=KRT8 PE=1 SV=7 - [K2C8_HUMAN]
Leucine-rich repeat neuronal protein 4 OS=Homo sapiens GN=LRRN4 PE=1 SV=3 - [LRRN4_HUMAN]
Desmoplakin OS=Homo sapiens GN=DSP PE=1 SV=3 - [DESP_HUMAN]
Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1 - [ACTB_HUMAN]
Spectrin repeat-containing, nuclear envelope 1 OS=Homo sapiens GN=SYNE1 PE=4 SV=1 - [E9PEL9_HUMAN]
Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2 - [ALBU_HUMAN]
Apolipoprotein B-100 OS=Homo sapiens GN=APOB PE=1 SV=2 - [APOB_HUMAN]
Elongation factor 1-alpha 1 OS=Homo sapiens GN=EEF1A1 PE=1 SV=1 - [EF1A1_HUMAN]
ATP synthase subunit alpha OS=Homo sapiens GN=ATP5A1 PE=2 SV=1 - [A8K092_HUMAN]
60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPD1 PE=1 SV=2 - [CH60_HUMAN]
Heat shock 70kDa protein 9 (mortalin) OS=Homo sapiens GN=HSPA9 PE=2 SV=1 - [B7Z4V2_HUMAN]
Spectrin beta chain, brain 1 OS=Homo sapiens GN=SPTBN1 PE=1 SV=2 - [SPTB2_HUMAN]
Isoform 2 of Sacsin OS=Homo sapiens GN=SACS - [SACS_HUMAN]
78 kDa glucose-regulated protein OS=Homo sapiens GN=HSPA5 PE=1 SV=2 - [GRP78_HUMAN]
Keratin 4 OS=Homo sapiens GN=KRT4 PE=3 SV=1 - [F8VS64_HUMAN]
Isoform Short of Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase OS=Homo sapiens GN=ALDH18A1 - [P5CS_HUMAN]
Protein S100-A9 OS=Homo sapiens GN=S100A9 PE=1 SV=1 - [S10A9_HUMAN]
Hypoxia up-regulated 1 OS=Homo sapiens GN=HYOU1 PE=3 SV=1 - [E9PL22_HUMAN]
Isoform 1 of Ribosome-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=RRBP1 - [RRBP1_HUMAN]
Elongation factor Tu, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=TUFM PE=1 SV=2 - [EFTU_HUMAN]
ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5B PE=1 SV=3 - [ATPB_HUMAN]
TNF receptor-associated protein 1 OS=Homo sapiens GN=TRAP1 PE=3 SV=1 - [F5H897_HUMAN]
Isoform 2 of Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ACADVL - [ACADV_HUMAN]
Dermcidin OS=Homo sapiens GN=DCD PE=1 SV=2 - [DCD_HUMAN]
Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HADHA PE=1 SV=2 - [ECHA_HUMAN]
Protein phosphatase 1 regulatory subunit 37 OS=Homo sapiens GN=PPP1R37 PE=1 SV=4 - [PPR37_HUMAN]
KIAA0999 protein OS=Homo sapiens GN=KIAA0999 PE=2 SV=1 - [A1A5A9_HUMAN]
Ubiquitin C (Fragment) OS=Homo sapiens GN=UBC PE=4 SV=1 - [F5H265_HUMAN]
Isoform Short of Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 4 OS=Homo sapiens GN=ACSL4 - [ACSL4_HUMAN]
Adenylate kinase isoenzyme 4, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=AK4 PE=1 SV=1 - [KAD4_HUMAN]
Protease, serine, 3 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PRSS3 PE=3 SV=1 - [B1AN99_HUMAN]
Structural maintenance of chromosomes protein 3 OS=Homo sapiens GN=SMC3 PE=1 SV=2 - [SMC3_HUMAN]

Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M OS=Homo sapiens GN=HNRNPM - [HNRPM_HUMAN]
Arginase-1 OS=Homo sapiens GN=ARG1 PE=1 SV=2 - [ARG1_HUMAN]
Fatty acid synthase OS=Homo sapiens GN=FASN PE=1 SV=3 - [FAS_HUMAN]
Keratin, type II cytoskeletal 78 OS=Homo sapiens GN=KRT78 PE=2 SV=2 - [K2C78_HUMAN]
Homeobox protein TGIF1 OS=Homo sapiens GN=TGIF1 PE=1 SV=3 - [TGIF1_HUMAN]
Prohibitin 2 OS=Homo sapiens GN=PHB2 PE=4 SV=1 - [F5GY37_HUMAN]
Isoform 3 of Glutaminase kidney isoform, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=GLS - [GLSK_HUMAN]
Complement C3 OS=Homo sapiens GN=C3 PE=1 SV=2 - [CO3_HUMAN]
Desmoglein-1 OS=Homo sapiens GN=DSG1 PE=1 SV=2 - [DSG1_HUMAN]
Protein furry homolog OS=Homo sapiens GN=FRY PE=1 SV=1 - [FRY_HUMAN]
Ras-related protein Rab-8B OS=Homo sapiens GN=RAB8B PE=1 SV=2 - [RAB8B_HUMAN]
Serpin H1 OS=Homo sapiens GN=SERPINH1 PE=1 SV=2 - [SERPH_HUMAN]
Isoform 12 of Fibronectin OS=Homo sapiens GN=FN1 - [FNC_HUMAN]
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D (AU-rich element RNA-binding protein 1, 37kDa) (Fragment) OS=Homo sapiens GN=HNRNPD PE=4 SV=1 - [D6RF44_HUMAN]
Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ACADM PE=1 SV=1 - [ACADM_HUMAN]
Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1 OS=Homo sapiens GN=P4HA1 PE=1 SV=2 - [P4HA1_HUMAN]
Protein S100-A7 OS=Homo sapiens GN=S100A7 PE=1 SV=4 - [S10A7_HUMAN]
Acyl-CoA dehydrogenase, short/branched chain OS=Homo sapiens GN=ACADSB PE=2 SV=1 - [B4DQ51_HUMAN]
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Homo sapiens GN=HNRNPK PE=2 SV=1 - [Q5T6W5_HUMAN]
Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=UQCRC2 PE=1 SV=3 - [QCR2_HUMAN]
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 OS=Homo sapiens GN=VDAC1 PE=1 SV=2 - [VDAC1_HUMAN]
Caspase-14 OS=Homo sapiens GN=CASP14 PE=1 SV=2 - [CASPE_HUMAN]
Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar2 OS=Homo sapiens GN=SLC25A13 PE=1 SV=2 - [CMC2_HUMAN]
CCR4-NOT transcription complex subunit 1 OS=Homo sapiens GN=CNOT1 PE=1 SV=2 - [CNOT1_HUMAN]
Hornerin OS=Homo sapiens GN=HRNR PE=1 SV=2 - [HORN_HUMAN]
Lysozyme C OS=Homo sapiens GN=LYZ PE=1 SV=1 - [LYSC_HUMAN]
Protein S100-A8 OS=Homo sapiens GN=S100A8 PE=1 SV=1 - [S10A8_HUMAN]
Isoform B of Phosphate carrier protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=SLC25A3 - [MPCP_HUMAN]
Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=SLC3A2 PE=2 SV=1 - [B4E2Z3_HUMAN]
Ribosomal protein, large, P0 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPLP0 PE=3 SV=1 - [F8VU65_HUMAN]
Filaggrin-2 OS=Homo sapiens GN=FLG2 PE=1 SV=1 - [FILA2_HUMAN]
Histone H2A type 1-H OS=Homo sapiens GN=HIST1H2AH PE=1 SV=3 - [H2A1H_HUMAN]
Heat shock protein HSP 90-beta OS=Homo sapiens GN=HSP90AB1 PE=1 SV=4 - [HS90B_HUMAN]
Peroxisredoxin-1 OS=Homo sapiens GN=PRDX1 PE=1 SV=1 - [PRDX1_HUMAN]
Suprabasin OS=Homo sapiens GN=SBSN PE=4 SV=1 - [E9PBV3_HUMAN]
Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=AZGP1 PE=4 SV=1 - [C9JAB1_HUMAN]

Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=CCT3 PE=3 SV=1 - [E9PAQ6_HUMAN]
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM44 OS=Homo sapiens GN=TIMM44 PE=1 SV=2 - [TIM44_HUMAN]
Cathepsin D OS=Homo sapiens GN=CTSD PE=1 SV=1 - [CATD_HUMAN]
Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ETFA PE=1 SV=1 - [ETFA_HUMAN]
Putative rhophilin-2-like protein OS=Homo sapiens PE=5 SV=2 - [RHN2L_HUMAN]
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Homo sapiens GN=HNRNPA2B1 PE=1 SV=2 - [ROA2_HUMAN]
Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog OS=Homo sapiens GN=VAT1 PE=1 SV=2 - [VAT1_HUMAN]
Chromosome 9 open reading frame 84 OS=Homo sapiens GN=C9orf84 PE=4 SV=1 - [A6PVK7_HUMAN]
Ribosomal protein L7 OS=Homo sapiens GN=RPL7 PE=3 SV=1 - [A8MUD9_HUMAN]
Apolipoprotein E (Fragment) OS=Homo sapiens GN=APOE PE=4 SV=1 - [E9PEV4_HUMAN]
Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 OS=Homo sapiens GN=HNRNPA1 - [ROA1_HUMAN]
Serine hydroxymethyltransferase OS=Homo sapiens GN=SHMT2 PE=2 SV=1 - [B7Z9F1_HUMAN]
Tubulin, alpha 1c OS=Homo sapiens GN=TUBA1C PE=4 SV=1 - [E9PGK3_HUMAN]
Intersectin 1 (SH3 domain protein) OS=Homo sapiens GN=ITSN1 PE=4 SV=1 - [F8W7L8_HUMAN]
Protein NipSnap homolog 1 OS=Homo sapiens GN=NIPSNAP1 PE=1 SV=1 - [NIPS1_HUMAN]
Prohibitin OS=Homo sapiens GN=PHB PE=1 SV=1 - [PHB_HUMAN]
40S ribosomal protein S3 OS=Homo sapiens GN=RPS3 PE=1 SV=2 - [RS3_HUMAN]
Histone H4 OS=Homo sapiens GN=HIST1H4A PE=1 SV=2 - [H4_HUMAN]
Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens GN=HBA1 PE=1 SV=2 - [HBA_HUMAN]
Prolactin-inducible protein OS=Homo sapiens GN=PIP PE=1 SV=1 - [PIP_HUMAN]
Ras-related protein Rab-7a OS=Homo sapiens GN=RAB7A PE=1 SV=1 - [RAB7A_HUMAN]
T-complex protein 1 subunit delta OS=Homo sapiens GN=CCT4 PE=1 SV=4 - [TCPD_HUMAN]
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C (C1/C2) (Fragment) OS=Homo sapiens GN=HNRNPC PE=4 SV=1 - [G3V555_HUMAN]
Protease, serine, 1 (trypsin 1) (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PRSS1 PE=3 SV=1 - [H0Y8D1_HUMAN]
ADP/ATP translocase 2 OS=Homo sapiens GN=SLC25A5 PE=1 SV=7 - [ADT2_HUMAN]
ADP/ATP translocase 3 OS=Homo sapiens GN=SLC25A6 PE=1 SV=4 - [ADT3_HUMAN]
ATP synthase subunit O, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5O PE=1 SV=1 - [ATPO_HUMAN]
Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=MTHFD2 PE=2 SV=1 - [B4DY35_HUMAN]
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B OS=Homo sapiens GN=HNRNPAB PE=4 SV=1 - [D6R9P3_HUMAN]
Chaperone activity of bc1 complex-like, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ADCK3 PE=1 SV=1 - [ADCK3_HUMAN]
Metabotropic glutamate receptor 6 OS=Homo sapiens GN=GRM6 PE=1 SV=2 - [GRM6_HUMAN]
Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=IGF2BP1 PE=1 SV=2 - [IF2B1_HUMAN]
NADPH--cytochrome P450 reductase OS=Homo sapiens GN=POR PE=1 SV=2 - [NCPR_HUMAN]
Preylcysteine oxidase 1 OS=Homo sapiens GN=PCYOX1 PE=1 SV=3 - [PCYOX_HUMAN]
Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=STOM PE=2 SV=1 - [B4E2V5_HUMAN]
Enoyl-CoA delta isomerase 2 OS=Homo sapiens GN=ECI2 PE=4 SV=1 - [C9J000_HUMAN]
Tubulin, beta class I OS=Homo sapiens GN=TUBB PE=3 SV=1 - [F8VUJ7_HUMAN]



ATPase, Ca <sup>++</sup> -transporting, plasma membrane 2 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=ATP2B2 PE=3 SV=1 - [H0Y7S3_HUMAN]
Adenylate kinase 3 OS=Homo sapiens GN=AK3 PE=3 SV=1 - [E7ET30_HUMAN]
Lamin A/C OS=Homo sapiens GN=LMNA PE=2 SV=1 - [Q3BDU5_HUMAN]
ATP synthase subunit gamma, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5C1 PE=1 SV=1 - [ATPG_HUMAN]
Ig kappa chain V-IV region Len OS=Homo sapiens PE=1 SV=2 - [KV402_HUMAN]
Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=STOML2 PE=2 SV=1 - [B4E1K7_HUMAN]
40S ribosomal protein S18 OS=Homo sapiens GN=RPS18 PE=1 SV=3 - [RS18_HUMAN]
D-3-phosphoglycerate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=PHGDH PE=1 SV=4 - [SERA_HUMAN]
T-complex protein 1 subunit alpha OS=Homo sapiens GN=TCP1 PE=1 SV=1 - [TCPA_HUMAN]
Isoform 2 of Uncharacterized protein KIAA0564 OS=Homo sapiens GN=KIAA0564 - [K0564_HUMAN]
Annexin (Fragment) OS=Homo sapiens GN=ANXA2 PE=3 SV=1 - [H0YMM1_HUMAN]
Isoform 2 of Hydroxysteroid dehydrogenase-like protein 2 OS=Homo sapiens GN=HSDL2 - [HSDL2_HUMAN]
Suppressor of variegation 3-9 homolog 1 (Drosophila) OS=Homo sapiens GN=SUV39H1 PE=3 SV=1 - [F5H530_HUMAN]
DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 15 OS=Homo sapiens GN=DHX15 PE=4 SV=1 - [F5H6K0_HUMAN]
Uncharacterized protein OS=Homo sapiens PE=4 SV=1 - [H0YLA9_HUMAN]
Coiled-coil domain-containing protein 42A OS=Homo sapiens GN=CCDC42 PE=2 SV=2 - [CCD42_HUMAN]
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit OS=Homo sapiens GN=DDOST PE=1 SV=4 - [OST48_HUMAN]
Cytochrome b5 reductase 3 OS=Homo sapiens GN=CYB5R3 PE=2 SV=1 - [B7Z7L3_HUMAN]
Catalase OS=Homo sapiens GN=CAT PE=1 SV=3 - [CATA_HUMAN]
Colipase-like protein C6orf126 OS=Homo sapiens GN=C6orf126 PE=1 SV=3 - [CF126_HUMAN]
Cystatin-SN OS=Homo sapiens GN=CST1 PE=1 SV=3 - [CYTN_HUMAN]
Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=NDUFS1 PE=2 SV=1 - [B4DJ81_HUMAN]
Uncharacterized protein OS=Homo sapiens GN=PDHB PE=2 SV=1 - [B4DDD7_HUMAN]
Cytochrome c oxidase subunit 2 OS=Homo sapiens GN=MT-CO2 PE=1 SV=1 - [COX2_HUMAN]
Estradiol 17-beta-dehydrogenase 12 OS=Homo sapiens GN=HSD17B12 PE=1 SV=2 - [DHB12_HUMAN]
Pyrroline-5-carboxylate reductase 2 OS=Homo sapiens GN=PYCR2 PE=1 SV=1 - [P5CR2_HUMAN]
40S ribosomal protein S10 OS=Homo sapiens GN=RPS10 PE=1 SV=1 - [RS10_HUMAN]
Isoform 2 of Phosphatidylinositol 4-kinase beta OS=Homo sapiens GN=PI4KB - [PI4KB_HUMAN]
Isoform 4 of Glutathione S-transferase kappa 1 OS=Homo sapiens GN=GSTK1 - [GSTK1_HUMAN]
Homeobox protein engrailed-2 OS=Homo sapiens GN=EN2 PE=1 SV=3 - [HME2_HUMAN]
Lipocalin-1 OS=Homo sapiens GN=LCN1 PE=1 SV=1 - [LCN1_HUMAN]
Reticulocalbin 2, EF-hand calcium-binding domain (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RCN2 PE=4 SV=1 - [H0YL43_HUMAN]
DJ579N16.4 protein OS=Homo sapiens GN=dJ579N16.4 PE=2 SV=1 - [Q6IC89_HUMAN]
Ig kappa chain V-I region Lay OS=Homo sapiens PE=1 SV=1 - [KV113_HUMAN]
NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=NDUFS3 PE=1 SV=1 - [NDUS3_HUMAN]
Glutamyl-peptide cyclotransferase OS=Homo sapiens GN=QPCT PE=1 SV=1 - [QPCT_HUMAN]
Ras-related protein Rab-5C OS=Homo sapiens GN=RAB5C PE=1 SV=2 - [RAB5C_HUMAN]

40S ribosomal protein S20 OS=Homo sapiens GN=RPS20 PE=1 SV=1 - [RS20_HUMAN]
Cystatin A (stefin A) OS=Homo sapiens GN=CSTA PE=4 SV=1 - [C9J0E4_HUMAN]
Chromosome 20 open reading frame 3 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=C20orf3 PE=4 SV=1 - [H0Y512_HUMAN]
Death associated protein 3, isoform CRA_d OS=Homo sapiens GN=DAP3 PE=2 SV=1 - [B4DP59_HUMAN]
Regulatory factor X, 7 OS=Homo sapiens GN=RFX7 PE=4 SV=1 - [H0YLY2_HUMAN]
Uncharacterized protein C7orf66 OS=Homo sapiens GN=C7orf66 PE=4 SV=1 - [CG066_HUMAN]
BPI fold-containing family C OS=Homo sapiens GN=BPIFC PE=4 SV=1 - [F5H3G0_HUMAN]
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 5, 13kDa OS=Homo sapiens GN=NDUFA5 PE=4 SV=1 - [F8WAS3_HUMAN]
Ribosomal protein, large, P2 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPLP2 PE=4 SV=1 - [H0YDD8_HUMAN]
Ribosomal protein L11 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPL11 PE=2 SV=1 - [Q5VVC9_HUMAN]
Isoform 2 of DDRGK domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=DDRGK1 - [DDRGK_HUMAN]
RAB2A, member RAS oncogene family OS=Homo sapiens GN=RAB2A PE=3 SV=1 - [F5H399_HUMAN]

#### 4.3.1.2 Ανάλυση – κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων της MS ανάλυσης του δείγματος 2F8-GR σε σχέση με αυτών του mIgG δείγματος

Μετά από σύγκριση των μορίων των δύο δειγμάτων (2F8-GR, mIgG) προέκυψε ο Πίνακας 1,1 όπου αναγράφονται τα μόρια που συναντώνται μόνο στο δείγμα 2F8-GR και όχι στο δείγμα mIgG. Όπως αναμενόταν ο GR ανιχνεύεται μόνο στο δείγμα 2F8-GR, επαληθεύοντας και την επιτυχή εκτέλεση της διαδικασίας της ανοσοκατακρήμνισης. Τα υπόλοιπα μόρια χαρακτηρίζονται ως εν δυνάμει μόρια άμεσης ή έμμεσης αλληλεπίδρασης με τον GR.

**Πίνακας 11. Τα μόρια που ανιχνεύονται μόνο στο δείγμα 2F8-GR και όχι στο mIgG.**

<b>Μόρια που ανιχνεύθηκαν αποκλειστικά στο δείγμα 2F8-GR (απών στο mIgG)</b>
<b>Glucocorticoid receptor OS=Homo sapiens GN=NR3C1 - [GCR_HUMAN]. Accession #: P04150-2</b>
<b>Isoform 2 of Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PDHB - [ODPB_HUMAN]. Accession #: P11177-2</b>
<b>Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial (Fragment) OS=Homo sapiens GN=DLAT PE=3 SV=1 - [H0YDD4_HUMAN]. Accession #: H0YDD4</b>
<b>NADPH--cytochrome P450 reductase OS=Homo sapiens GN=POR PE=1 SV=2 - [NCPR_HUMAN]. Accession #: P16435</b>
<b>Isoform 3 of Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PDHA1 - [ODPA_HUMAN]. Accession #: P08559-3</b>
<b>Calnexin OS=Homo sapiens GN=CANX PE=1 SV=2 - [CALX_HUMAN]. Accession #: P27824</b>

Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 3 OS=Homo sapiens GN=ACSL3 PE=1 SV=3 - [ACSL3_HUMAN]. Accession #: D6RER0
Peroxisomal multifunctional enzyme type 2 OS=Homo sapiens GN=HSD17B4 PE=1 SV=3 - [DHB4_HUMAN]. Accession #: P51659
Protein S100-A9 OS=Homo sapiens GN=S100A9 PE=1 SV=1 - [S10A9_HUMAN]. Accession #: P06702
Transgelin-2 OS=Homo sapiens GN=TAGLN2 PE=1 SV=3 - [TAGL2_HUMAN]. Accession #: P37802
Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1 OS=Homo sapiens GN=ACSL1 PE=2 SV=1 - [D6RER0_HUMAN]
Putative golgin subfamily A member 6-like protein 7 OS=Homo sapiens PE=5 SV=1 - [GG6L7_HUMAN]. Accession #: A6NCM5
Sodium-driven chloride bicarbonate exchanger OS=Homo sapiens GN=SLC4A10 PE=2 SV=1 - [B7Z2J0_HUMAN]. Accession #: B7Z2J0
Prenylcysteine oxidase 1 OS=Homo sapiens GN=PCYOX1 PE=2 SV=1 - [B7Z3Y2_HUMAN]. Accession #: B7Z3Y2
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit OS=Homo sapiens GN=DDOST PE=2 SV=1 - [E7EWT1_HUMAN]. Accession #: E7EWT1
Isoform 2 of Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens GN=ASAP2 - [ASAP2_HUMAN]. Accession #: O43150-2
Hornerin OS=Homo sapiens GN=HRNR PE=1 SV=2 - [HORN_HUMAN]. Accession #: Q86YZ3
Ig gamma-2 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG2 PE=1 SV=2 - [IGHG2_HUMAN]. Accession #: P01859
Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=UQCRC2 PE=4 SV=1 - [H3BSJ9_HUMAN]. Accession #: H3BSJ9
ATPase family AAA domain-containing protein 3B OS=Homo sapiens GN=ATAD3B PE=2 SV=2 - [A6NFL3_HUMAN]. Accession #: A6NFL3
Lysozyme C OS=Homo sapiens GN=LYZ PE=2 SV=1 - [F8VV32_HUMAN]. Accession #: F8VV32
Lipopolysaccharide-responsive and beige-like anchor protein (Fragment) OS=Homo sapiens GN=LRBA PE=4 SV=1 - [H0YAC6_HUMAN]. Accession #: H0YAC6
Isoform 3 of Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1 OS=Homo sapiens GN=P4HA1 - [P4HA1_HUMAN]. Accession #: P13674-3
Isoform 2 of Uncharacterized protein KIAA0825 OS=Homo sapiens GN=KIAA0825 - [K0825_HUMAN]. Accession #: Q8IV33-2
Isoform 2 of Adipocyte plasma membrane-associated protein OS=Homo sapiens GN=APMAP - [APMAP_HUMAN]. Accession #: Q9HDC9-2
Probable serine carboxypeptidase CPVL OS=Homo sapiens GN=CPVL PE=1 SV=2 - [CPVL_HUMAN]. Accession #: Q9H3G5

### 4.3.2 Αποτελέσματα MS ανάλυσης από το 2<sup>ο</sup> πείραμα

#### 4.3.2.1 Όλα τα μόρια που προσδιορίστηκαν στο σύμπλοκο ανοσοκατακρήμνισης των δειγμάτων mIgG και 2F8-GR

Στους Πίνακες 12 και 13 αναγράφονται όλα τα μόρια που ανιχνεύθηκαν με την μέθοδο MS των δειγμάτων mIgG και 2F8-GR αντίστοιχα της 2<sup>ης</sup> ανοσοκατακρήμνισης.

**Πίνακας 12. Μόρια που ανιχνεύθηκαν στο σύμπλοκο ανοσοκατακρήμνισης του δείγματος mIgG της 2ης ανοσοκατακρήμνισης**

Μόρια που ανιχνεύθηκαν στο δείγμα mIgG
Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6 - [K2C1_HUMAN]
Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6 - [K1C10_HUMAN]
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2 - [K22E_HUMAN]
Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3 - [K1C9_HUMAN]
Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=4 - [K1C14_HUMAN]
Keratin, type I cytoskeletal 16 OS=Homo sapiens GN=KRT16 PE=1 SV=4 - [K1C16_HUMAN]
Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT5 PE=1 SV=3 - [K2C5_HUMAN]
Elongation factor 1-alpha 1 OS=Homo sapiens GN=EEF1A1 PE=1 SV=1 - [EF1A1_HUMAN]
Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Homo sapiens GN=KRT6A PE=1 SV=3 - [K2C6A_HUMAN]
Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1 - [ACTB_HUMAN]
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5A1 PE=1 SV=1 - [ATPA_HUMAN]
Keratin, type I cytoskeletal 17 OS=Homo sapiens GN=KRT17 PE=1 SV=2 - [K1C17_HUMAN]
Serpin H1 OS=Homo sapiens GN=SERPINH1 PE=1 SV=2 - [SERPH_HUMAN]
ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Homo sapiens GN=ATP5B PE=3 SV=1 - [H0YH81_HUMAN]
Tubulin beta chain OS=Homo sapiens GN=TUBB PE=3 SV=1 - [F8VUJ7_HUMAN]
60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPD1 PE=1 SV=2 - [CH60_HUMAN]
Elongation factor Tu, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=TUFM PE=1 SV=2 - [EFTU_HUMAN]
Adipocyte plasma membrane-associated protein OS=Homo sapiens GN=APMAP PE=1 SV=2 - [APMAP_HUMAN]
Protein disulfide-isomerase A6 OS=Homo sapiens GN=PDIA6 PE=2 SV=1 - [B7Z254_HUMAN]
Tubulin alpha-1A chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1A PE=2 SV=1 - [G3V1U9_HUMAN]
3-ketoacyl-CoA thiolase OS=Homo sapiens GN=HADHB PE=2 SV=1 - [B4E2W0_HUMAN]
Actin-like protein 7A OS=Homo sapiens GN=ACTL7A PE=1 SV=1 - [ACL7A_HUMAN]
Dermcidin OS=Homo sapiens GN=DCD PE=1 SV=2 - [DCD_HUMAN]
Leucine-rich repeat neuronal protein 4 OS=Homo sapiens GN=LRRN4 PE=1 SV=3 - [LRRN4_HUMAN]
Fatty aldehyde dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=ALDH3A2 PE=3 SV=1 - [J3QRD1_HUMAN]
Isoform 3 of Basigin OS=Homo sapiens GN=BSG - [BASI_HUMAN]
Prenylcysteine oxidase 1 OS=Homo sapiens GN=PCYOX1 PE=1 SV=3 - [PCYOX_HUMAN]
Perilipin-2 OS=Homo sapiens GN=PLIN2 PE=1 SV=2 - [PLIN2_HUMAN]
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit OS=Homo sapiens GN=DDOST PE=1 SV=4 - [OST48_HUMAN]

Short/branched chain-specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ACADSB PE=2 SV=1 - [B4DQ51_HUMAN]
Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2 - [ALBU_HUMAN]
CAAX prenyl protease 1 homolog OS=Homo sapiens GN=ZMPSTE24 PE=1 SV=2 - [FACE1_HUMAN]
Lanosterol 14-alpha demethylase OS=Homo sapiens GN=CYP51A1 PE=1 SV=3 - [CP51A_HUMAN]
Isoform 3 of Inactive caspase-12 OS=Homo sapiens GN=CASP12 - [CASPC_HUMAN]
Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=UQCRC1 PE=1 SV=3 - [QCR1_HUMAN]
Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ALDH1B1 PE=1 SV=3 - [AL1B1_HUMAN]
Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=UQCRC2 PE=3 SV=1 - [H3BRG4_HUMAN]
D-3-phosphoglycerate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=PHGDH PE=1 SV=4 - [SERA_HUMAN]
Isoform 2 of Keratin, type II cytoskeletal 78 OS=Homo sapiens GN=KRT78 - [K2C78_HUMAN]
Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=SUCLA2 PE=3 SV=1 - [F5GXC8_HUMAN]
Delta(24)-sterol reductase OS=Homo sapiens GN=DHCR24 PE=1 SV=2 - [DHC24_HUMAN]
Squalene synthase OS=Homo sapiens GN=FDFT1 PE=2 SV=1 - [B3KQ95_HUMAN]
Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog OS=Homo sapiens GN=VAT1 PE=2 SV=1 - [B0AZP7_HUMAN]
Epoxide hydrolase 1 OS=Homo sapiens GN=EPHX1 PE=1 SV=1 - [HYEP_HUMAN]
7-dehydrocholesterol reductase (Fragment) OS=Homo sapiens GN=DHCR7 PE=2 SV=1 - [E9PJ54_HUMAN]
Sterol-4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase, decarboxylating (Fragment) OS=Homo sapiens GN=NSDHL PE=2 SV=1 - [C9JDR0_HUMAN]
Isoform 2 of Probable Xaa-Pro aminopeptidase 3 OS=Homo sapiens GN=XPNPEP3 - [XPP3_HUMAN]
Isoform 2 of Chaperone activity of bc1 complex-like, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ADCK3 - [ADCK3_HUMAN]
Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM44 OS=Homo sapiens GN=TIMM44 PE=1 SV=2 - [TIM44_HUMAN]
Trypsin-1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PRSS1 PE=3 SV=1 - [H0Y8D1_HUMAN]
Isoform 2 of T-complex protein 1 subunit eta OS=Homo sapiens GN=CCT7 - [TCPH_HUMAN]
Probable serine carboxypeptidase CPVL (Fragment) OS=Homo sapiens GN=CPVL PE=4 SV=1 - [H7C218_HUMAN]
Synaptophysin-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=SYPL1 PE=2 SV=1 - [C9JYN0_HUMAN]
Golgi reassembly-stacking protein 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=GORASP1 PE=4 SV=1 - [H7C0J2_HUMAN]
Medium-chain-specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ACADM PE=2 SV=1 - [B4DJE7_HUMAN]
Elongation factor 1-gamma OS=Homo sapiens GN=EEF1G PE=1 SV=3 - [EF1G_HUMAN]
HLA class I histocompatibility antigen, Cw-14 alpha chain OS=Homo sapiens GN=HLA-C PE=2 SV=1 - [E9PLQ4_HUMAN]
Isoform 2 of Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2 OS=Homo sapiens GN=ARNT2 - [ARNT2_HUMAN]
Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type OS=Homo sapiens GN=PTPN1 PE=2 SV=1 - [B4DSN5_HUMAN]
Dimethylaniline monooxygenase [N-oxide-forming] 5 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=FMO5

PE=2 SV=1 - [E9PQ84_HUMAN]
MARCKS-related protein OS=Homo sapiens GN=MARCKSL1 PE=1 SV=2 - [MRP_HUMAN]
Vesicular integral-membrane protein VIP36 OS=Homo sapiens GN=LMAN2 PE=1 SV=1 - [LMAN2_HUMAN]
SLAIN motif-containing protein 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=SLAIN1 PE=2 SV=1 - [C9JP03_HUMAN]
Diacylglycerol O-acyltransferase 1 OS=Homo sapiens GN=DGAT1 PE=2 SV=1 - [E9PNR5_HUMAN]
Sterol 26-hydroxylase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=CYP27A1 PE=1 SV=1 - [CP27A_HUMAN]
Phosphatidylinositol phosphatase SAC1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=SACM1L PE=2 SV=1 - [C9JV50_HUMAN]
Epithelial cell adhesion molecule OS=Homo sapiens GN=EPCAM PE=1 SV=2 - [EPCAM_HUMAN]
Monocarboxylate transporter 4 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=SLC16A3 PE=4 SV=1 - [J3QQS9_HUMAN]
T-complex protein 1 subunit alpha OS=Homo sapiens GN=TCP1 PE=1 SV=1 - [TCPA_HUMAN]
Coiled-coil domain-containing protein 42A OS=Homo sapiens GN=CCDC42 PE=2 SV=2 - [CCD42_HUMAN]
Desmoglein-1 OS=Homo sapiens GN=DSG1 PE=1 SV=2 - [DSG1_HUMAN]
Glutamate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=GLUD1 PE=2 SV=1 - [B3KV55_HUMAN]
Histone H4 OS=Homo sapiens GN=HIST1H4A PE=1 SV=2 - [H4_HUMAN]
Asialoglycoprotein receptor 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=ASGR1 PE=4 SV=1 - [I3L2S9_HUMAN]
Sialidase-1 OS=Homo sapiens GN=NEU1 PE=4 SV=1 - [E9PIF4_HUMAN]
KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein 4 OS=Homo sapiens GN=KANK4 PE=2 SV=1 - [KANK4_HUMAN]
Serpin B12 OS=Homo sapiens GN=SERPINB12 PE=1 SV=1 - [SPB12_HUMAN]
Basal cell adhesion molecule OS=Homo sapiens GN=BCAM PE=1 SV=2 - [BCAM_HUMAN]
Desmoplakin OS=Homo sapiens GN=DSP PE=1 SV=3 - [DESP_HUMAN]
Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HADHA PE=1 SV=2 - [ECHA_HUMAN]
Endoplasmic reticulum protein OS=Homo sapiens GN=HSP90B1 PE=1 SV=1 - [ENPL_HUMAN]
Stress-70 protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPA9 PE=1 SV=2 - [GRP75_HUMAN]
78 kDa glucose-regulated protein OS=Homo sapiens GN=HSPA5 PE=1 SV=2 - [GRP78_HUMAN]
Intercellular adhesion molecule 1 OS=Homo sapiens GN=ICAM1 PE=1 SV=2 - [ICAM1_HUMAN]
Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=LRPPRC PE=1 SV=3 - [LRPPRC_HUMAN]
Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate OS=Homo sapiens GN=MARCKS PE=1 SV=4 - [MARCS_HUMAN]
Junction plakoglobin OS=Homo sapiens GN=JUP PE=1 SV=3 - [PLAK_HUMAN]
Transferrin receptor protein 1 OS=Homo sapiens GN=TFRC PE=1 SV=2 - [TFR1_HUMAN]
Serotransferrin OS=Homo sapiens GN=TF PE=1 SV=3 - [TRFE_HUMAN]
Vesicle-fusing ATPase OS=Homo sapiens GN=NSF PE=2 SV=1 - [B4DFA2_HUMAN]
Lysosome-associated membrane glycoprotein 1 OS=Homo sapiens GN=LAMP1 PE=2 SV=1 - [B4DWL3_HUMAN]
Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1 OS=Homo sapiens GN=ACSL1 PE=2 SV=1 - [B7Z3Z9_HUMAN]
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1 OS=Homo sapiens GN=RPN1 PE=2 SV=1 - [B7Z4L4_HUMAN]
Hypoxia up-regulated protein 1 OS=Homo sapiens GN=HYOU1 PE=2 SV=1 - [B7Z909_HUMAN]

Calnexin (Fragment) OS=Homo sapiens GN=CANX PE=2 SV=1 - [D6RAQ8_HUMAN]
(3R)-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=HSD17B4 PE=2 SV=3 - [E7ER27_HUMAN]
NADPH--cytochrome P450 reductase OS=Homo sapiens GN=POR PE=2 SV=1 - [E7EVY7_HUMAN]
Pyruvate carboxylase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PC PE=2 SV=1 - [E9PS68_HUMAN]
Mannosyl-oligosaccharide glucosidase OS=Homo sapiens GN=MOGS PE=2 SV=1 - [F5H6D0_HUMAN]
4F2 cell-surface antigen heavy chain (Fragment) OS=Homo sapiens GN=SLC3A2 PE=2 SV=1 - [F5H867_HUMAN]
Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=TRAP1 PE=2 SV=1 - [F5H897_HUMAN]
LVV-hemorphin-7 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=HBB PE=2 SV=1 - [F8W6P5_HUMAN]
ATPase family AAA domain-containing protein 3A (Fragment) OS=Homo sapiens GN=ATAD3A PE=4 SV=1 - [H0Y2W2_HUMAN]
Ubiquitin (Fragment) OS=Homo sapiens GN=UBB PE=4 SV=1 - [J3QSA3_HUMAN]
Isoform Short of Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 4 OS=Homo sapiens GN=ACSL4 - [ACSL4_HUMAN]
Isoform 2 of Fibrinogen alpha chain OS=Homo sapiens GN=FGA - [FIBA_HUMAN]
Isoform 12 of Fibronectin OS=Homo sapiens GN=FN1 - [FINC_HUMAN]
Isoform 3 of Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 OS=Homo sapiens GN=ATP1A1 - [AT1A1_HUMAN]
Isoform Short of Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase OS=Homo sapiens GN=ALDH18A1 - [P5CS_HUMAN]
Isoform 2 of Lysosome membrane protein 2 OS=Homo sapiens GN=SCARB2 - [SCRB2_HUMAN]
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=RPN2 PE=4 SV=1 - [Q5JYR4_HUMAN]
Isoform D of G antigen family D member 2 OS=Homo sapiens GN=XAGE1A - [GAGD2_HUMAN]
Isoform 3 of Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 5 OS=Homo sapiens GN=ACSL5 - [ACSL5_HUMAN]

**Πίνακας 13. Μόρια που ανιχνεύθηκαν στο σύμπλοκο ανοσοκατακρήμνισης του δείγματος 2F8-GR της 2ης ανοσοκατακρήμνισης.**

Μόρια που ανιχνεύθηκαν στο δείγμα 2F8-GR
Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6 - [K2C1_HUMAN]
Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6 - [K1C10_HUMAN]
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2 - [K22E_HUMAN]
Isoform 3 of Inactive caspase-12 OS=Homo sapiens GN=CASP12 - [CASPC_HUMAN]
Actin-like protein 7A OS=Homo sapiens GN=ACTL7A PE=1 SV=1 - [ACL7A_HUMAN]
Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3 - [K1C9_HUMAN]
60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPD1 PE=1 SV=2 - [CH60_HUMAN]
Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT5 PE=1 SV=3 - [K2C5_HUMAN]
Leucine-rich repeat neuronal protein 4 OS=Homo sapiens GN=LRRN4 PE=1 SV=3 - [LRRN4_HUMAN]
Keratin, type II cytoskeletal 6C OS=Homo sapiens GN=KRT6C PE=1 SV=3 - [K2C6C_HUMAN]
Keratin, type II cytoskeletal 8 OS=Homo sapiens GN=KRT8 PE=1 SV=7 - [K2C8_HUMAN]

Isoform 2 of Unconventional myosin-XVIIIb OS=Homo sapiens GN=MYO18B - [MY18B_HUMAN]
Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=4 - [K1C14_HUMAN]
Keratin, type I cytoskeletal 16 OS=Homo sapiens GN=KRT16 PE=1 SV=4 - [K1C16_HUMAN]
Trypsin-1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PRSS1 PE=3 SV=1 - [H0Y8D1_HUMAN]
Keratin, type I cytoskeletal 13 OS=Homo sapiens GN=KRT13 PE=3 SV=1 - [K7ERE3_HUMAN]
Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=DLAT PE=1 SV=3 - [ODP2_HUMAN]
Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2 - [ALBU_HUMAN]
Stress-70 protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPA9 PE=1 SV=2 - [GRP75_HUMAN]
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5A1 PE=1 SV=1 - [ATPA_HUMAN]
Suprabasin OS=Homo sapiens GN=SBSN PE=2 SV=2 - [SBSN_HUMAN]
Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1 - [ACTB_HUMAN]
Tubulin beta chain OS=Homo sapiens GN=TUBB PE=3 SV=1 - [F8VUJ7_HUMAN]
Elongation factor 1-alpha 1 OS=Homo sapiens GN=EEF1A1 PE=1 SV=1 - [EF1A1_HUMAN]
Pyruvate dehydrogenase protein X component, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PDHX PE=2 SV=1 - [E9PB14_HUMAN]
Isoform Alpha of Glucocorticoid receptor OS=Homo sapiens GN=NR3C1 - [GCR_HUMAN]
Dermcidin OS=Homo sapiens GN=DCD PE=1 SV=2 - [DCD_HUMAN]
78 kDa glucose-regulated protein OS=Homo sapiens GN=HSPA5 PE=1 SV=2 - [GRP78_HUMAN]
Isoform Short of Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase OS=Homo sapiens GN=ALDH18A1 - [P5CS_HUMAN]
ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5B PE=1 SV=3 - [ATPB_HUMAN]
Serine/threonine-protein kinase SIK3 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=SIK3 PE=4 SV=1 - [H7C3X8_HUMAN]
Isoform 2 of Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PDHB - [ODPB_HUMAN]
Filaggrin-2 OS=Homo sapiens GN=FLG2 PE=1 SV=1 - [FILA2_HUMAN]
Hornerin OS=Homo sapiens GN=HRNR PE=1 SV=2 - [HORN_HUMAN]
Solute carrier family 52, riboflavin transporter, member 2 OS=Homo sapiens GN=SLC52A2 PE=2 SV=1 - [E9PJC1_HUMAN]
Isoform 3 of Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PDHA1 - [ODPA_HUMAN]
Apolipoprotein A-II OS=Homo sapiens GN=APOA2 PE=1 SV=1 - [APOA2_HUMAN]
Cystatin-A OS=Homo sapiens GN=CSTA PE=2 SV=1 - [C9J0E4_HUMAN]
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=HNRNPD PE=2 SV=1 - [D6RF44_HUMAN]
Tubulin alpha-1A chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1A PE=2 SV=1 - [G3V1U9_HUMAN]
Lysozyme C OS=Homo sapiens GN=LYZ PE=2 SV=1 - [F8VV32_HUMAN]
Pyrroline-5-carboxylate reductase 1, mitochondrial (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PYCR1 PE=4 SV=1 - [J3QL24_HUMAN]
Histone H2A type 1-H OS=Homo sapiens GN=HIST1H2AH PE=1 SV=3 - [H2A1H_HUMAN]
Isoform 2 of Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2 OS=Homo sapiens GN=ARNT2 - [ARNT2_HUMAN]
Isoform 3 of Glutaminase kidney isoform, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=GLS - [GLSK_HUMAN]
Protein S100-A8 OS=Homo sapiens GN=S100A8 PE=1 SV=1 - [S10A8_HUMAN]
Centlein OS=Homo sapiens GN=CNTLN PE=4 SV=1 - [J3KN33_HUMAN]



Alpha-amylase 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=AMY1B PE=3 SV=1 - [Q5T085_HUMAN]
Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens GN=HBA1 PE=1 SV=2 - [HBA_HUMAN]
T-box transcription factor TBX20 OS=Homo sapiens GN=TBX20 PE=1 SV=4 - [TBX20_HUMAN]
Isoform 4 of Multiple inositol polyphosphate phosphatase 1 OS=Homo sapiens GN=MINPP1 - [MINP1_HUMAN]
UDP-glucuronosyltransferase 2A3 OS=Homo sapiens GN=UGT2A3 PE=3 SV=1 - [F5GY78_HUMAN]
Zinc finger protein Helios OS=Homo sapiens GN=IKZF2 PE=2 SV=1 - [F5H8M1_HUMAN]
Band 4.1-like protein 2 OS=Homo sapiens GN=EPB41L2 PE=2 SV=1 - [Q6ZSX4_HUMAN]

#### 4.3.2.2 Ανάλυση – κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων της MS ανάλυσης του δείγματος 2F8-GR σε σχέση με αυτών του mIgG δείγματος

Μετά από σύγκριση των μορίων των δύο δειγμάτων (2F8-GR, mIgG) προέκυψε ο Πίνακας 14 όπου αναγράφονται τα μόρια που συναντώνται μόνο στο δείγμα 2F8-GR και όχι στο δείγμα mIgG της 2<sup>ης</sup> ανοσοκατακρήμνισης. Όπως αναμενόταν ο GR ανιχνεύεται μόνο στο δείγμα 2F8-GR, επαληθεύοντας και την επιτυχή εκτέλεση της διαδικασίας της ανοσοκατακρήμνισης. Τα υπόλοιπα μόρια χαρακτηρίζονται ως εν δυνάμει μόρια άμεσης ή έμμεσης αλληλεπίδρασης με τον GR.

**Πίνακας 14.** Τα μόρια που συναντώνται αποκλειστικά στο δείγμα 2F8-GR της 2ης ανοσοκατακρήμνισης, καθώς και μόρια που εμφανίζονται σε μεγάλη και μέτρια συχνότητα σε σχέση με την συχνότητά τους στο δείγμα IgG.

<b>Μόρια μόνο στο 2F8-GR και όχι στο mIgG Μόρια με μέτρια (medium) και υψηλή (high) συχνότητα στο 2F8-GR και χαμηλή (low) στο mIgG</b>
<b>Isoform 3 of Inactive caspase-12 OS=Homo sapiens GN=CASP12 - [CASPC_HUMAN]. Accession #: Q6UXS9-3 <u>medium</u></b>
<b>Actin-like protein 7A OS=Homo sapiens GN=ACTL7A PE=1 SV=1 - [ACL7A_HUMAN]. Accession #: Q9Y615 <u>medium</u></b>
<b>Isoform 2 of Unconventional myosin-XVIIIb OS=Homo sapiens GN=MYO18B - [MY18B_HUMAN]. Accession #: Q8IUG5-2</b>
<b>Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=DLAT PE=1 SV=3 - [ODP2_HUMAN]. Accession #: P10515</b>
<b>ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5A1 PE=1 SV=1 - [ATPA_HUMAN]. Accession #: P25705 <u>high</u></b>
<b>Suprabasin OS=Homo sapiens GN=SBSN PE=2 SV=2 - [SBSN_HUMAN]. Accession #: Q6UWP8</b>
<b>Pyruvate dehydrogenase protein X component, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PDHX PE=2 SV=1 - [E9PB14_HUMAN]. Accession #: E9PB14</b>
<b>Isoform Alpha of Glucocorticoid receptor OS=Homo sapiens GN=NR3C1 - [GCR_HUMAN]. Accession #: P04150-9</b>
<b>ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5B PE=1 SV=3 - [ATPB_HUMAN]. Accession #: P06576</b>

Serine/threonine-protein kinase SIK3 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=SIK3 PE=4 SV=1 - [H7C3X8_HUMAN]. Accession #: H7C3X8
Isoform 2 of Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PDHB - [ODPB_HUMAN]. Accession #: P11177-2
Filaggrin-2 OS=Homo sapiens GN=FLG2 PE=1 SV=1 - [FILA2_HUMAN]. Accession #: Q5D862
Hornerin OS=Homo sapiens GN=HRNR PE=1 SV=2 - [HORN_HUMAN]. Accession #: Q86YZ3
Solute carrier family 52, riboflavin transporter, member 2 OS=Homo sapiens GN=SLC52A2 PE=2 SV=1 - [E9PJC1_HUMAN]. Accession #: E9PJC1
Isoform 3 of Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PDHA1 - [ODPA_HUMAN]. Accession #: P08559-3
Apolipoprotein A-II OS=Homo sapiens GN=APOA2 PE=1 SV=1 - [APOA2_HUMAN]. Accession #: P02652
Cystatin-A OS=Homo sapiens GN=CSTA PE=2 SV=1 - [C9J0E4_HUMAN]. Accession #: C9J0E4
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=HNRNPD PE=2 SV=1 - [D6RF44_HUMAN]. Accession #: D6RF44
Lysozyme C OS=Homo sapiens GN=LYZ PE=2 SV=1 - [F8VV32_HUMAN]. Accession #: F8VV32
Pyrroline-5-carboxylate reductase 1, mitochondrial (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PYCR1 PE=4 SV=1 - [J3QL24_HUMAN]. Accession #: J3QL24
Histone H2A type 1-H OS=Homo sapiens GN=HIST1H2AH PE=1 SV=3 - [H2A1H_HUMAN]. Accession #: Q96KK5
Isoform 2 of Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2 OS=Homo sapiens GN=ARNT2 - [ARNT2_HUMAN]. Accession #: Q9HBZ2-2 <i>medium</i>
Isoform 3 of Glutaminase kidney isoform, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=GLS - [GLSK_HUMAN]. Accession #: O94925-3
Protein S100-A8 OS=Homo sapiens GN=S100A8 PE=1 SV=1 - [S10A8_HUMAN]. Accession #: P05109
Centlein OS=Homo sapiens GN=CNTRLN PE=4 SV=1 - [J3KN33_HUMAN]. Accession #: J3KN33
Alpha-amylase 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=AMY1B PE=3 SV=1 - [Q5T085_HUMAN]. Accession #: Q5T085
Hemoglobin subunit alpha OS=Homo sapiens GN=HBA1 PE=1 SV=2 - [HBA_HUMAN]. Accession #: P69905
T-box transcription factor TBX20 OS=Homo sapiens GN=TBX20 PE=1 SV=4 - [TBX20_HUMAN]. Accession #: Q9UMR3
Isoform 4 of Multiple inositol polyphosphate phosphatase 1 OS=Homo sapiens GN=MINPP1 - [MINP1_HUMAN]. Accession #: Q9UNW1-4
UDP-glucuronosyltransferase 2A3 OS=Homo sapiens GN=UGT2A3 PE=3 SV=1 - [F5GY78_HUMAN]. Accession #: F5GY78
Zinc finger protein Helios OS=Homo sapiens GN=IKZF2 PE=2 SV=1 - [F5H8M1_HUMAN]. Accession #: F5H8M1
Band 4.1-like protein 2 OS=Homo sapiens GN=EPB41L2 PE=2 SV=1 -

[Q6ZSX4\_HUMAN]. Accession #: Q6ZSX4

#### 4.3.3 Ομαδοποίηση των κοινών μορίων των δειγμάτων 2F8

Ο Πίνακας 15 παραθέτει τα κοινά μόρια που ανιχνεύονται ως μόρια άμεσης ή έμμεσης αλληλεπίδρασης αποκλειστικά με τον GR και όχι με τα mIgG και στα δύο ανεξάρτητα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης.

**Πίνακας 15. Τα κοινά μόρια των δύο δειγμάτων 2F8**

2F8	
1 <sup>ο</sup>	2 <sup>ο</sup>
Isoform Alpha of Glucocorticoid receptor OS=Homo sapiens GN=NR3C1 - [GCR_HUMAN]. Accession #: P04150-9	
Isoform 2 of Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PDHB - [ODPB_HUMAN]. Accession #: P11177-2	
Isoform 3 of Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PDHA1 - [ODPA_HUMAN]. Accession #: P08559-3	
Hornerin OS=Homo sapiens GN=HRNR PE=1 SV=2 - [HORN_HUMAN]. Accession #: Q86YZ3	
Lysozyme C OS=Homo sapiens GN=LYZ PE=2 SV=1 - [F8VV32_HUMAN]. Accession #: F8VV32	
Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=DLAT PE=1 SV=3 - [ODP2_HUMAN]. Accession #: P10515	
Protein S100-A9 OS=Homo sapiens GN=S100A9 PE=1 SV=1 - [S10A9_HUMAN]. Accession #: P06702	Protein S100-A8 OS=Homo sapiens GN=S100A8 PE=1 SV=1 - [S10A8_HUMAN]. Accession #: P05109

#### 4.3.4 Ανάλυση αποτελεσμάτων MS ανάλυσης με τη μέθοδο LFQ

Στους Πίνακες 16 – 18 κατηγοριοποιούνται όλα τα μόρια που αλληλεπιδρούν με τον GR και από τα δύο πειράματα, σύμφωνα με το επίπεδο επιβεβαίωσής τους ως αλληλεπιδρώντα μόρια.

**Πίνακας 16. High confident GR-interacting proteins. Μόρια υψηλής πιστότητας ως προς το χαρακτηρισμό τους ως mtGR αλληλεπιδρώντα μόρια.**

High confident GR-interactive proteins	
>sp P27824 CALX_HUMAN Calnexin OS=Homo sapiens GN=CANX PE=1 SV=2;	
>tr D6RF44 D6RF44_HUMAN Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	

(Fragment) OS=Homo sapiens GN=HNRNPD PE=2 SV=1
>tr B4E2W0 B4E2W0_HUMAN 3-ketoacyl-CoA thiolase OS=Homo sapiens GN=HADHB PE=2 SV=1;
>tr B7Z254 B7Z254_HUMAN Protein disulfide-isomerase A6 OS=Homo sapiens GN=PDIA6 PE=2 SV=1
>tr F5H5D3 F5H5D3_HUMAN Tubulin alpha-1C chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1C PE=2 SV=1
>tr F5H897 F5H897_HUMAN Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=TRAP1 PE=2 SV=1
sp O00330-3 ODPX_HUMAN Isoform 3 of Pyruvate dehydrogenase protein X component, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PDHX
>sp O60488-2 ACSL4_HUMAN Isoform Short of Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 4 OS=Homo sapiens GN=ACSL4
>sp P04150-2 GCR_HUMAN Isoform Beta of Glucocorticoid receptor OS=Homo sapiens GN=NR3C1
>sp P04843 RPN1_HUMAN Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1 OS=Homo sapiens GN=RPN1 PE=1 SV=1
>sp P05023-3 AT1A1_HUMAN Isoform 3 of Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 OS=Homo sapiens GN=ATP1A1
>sp P05109 S10A8_HUMAN Protein S100-A8 OS=Homo sapiens GN=S100A8 PE=1 SV=1
>sp P06576 ATPB_HUMAN ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5B PE=1 SV=3
>tr Q5JP53 Q5JP53_HUMAN Tubulin beta chain OS=Homo sapiens GN=TUBB PE=2 SV=1
>sp P08559-3 ODPA_HUMAN Isoform 3 of Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PDHA1
>sp P10515 ODP2_HUMAN Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=DLAT PE=1 SV=3
>sp P10809 CH60_HUMAN 60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPD1 PE=1 SV=2
>sp P11021 GRP78_HUMAN 78 kDa glucose-regulated protein OS=Homo sapiens GN=HSPA5 PE=1 SV=2
>sp P11177-2 ODPB_HUMAN Isoform 2 of Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PDHB
>sp P14625 ENPL_HUMAN Endoplasmin OS=Homo sapiens GN=HSP90B1 PE=1 SV=1
>sp P16435 NCPR_HUMAN NADPH--cytochrome P450 reductase OS=Homo sapiens GN=POR PE=1 SV=2
>sp P25705 ATPA_HUMAN ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5A1 PE=1 SV=1
>sp P38646 GRP75_HUMAN Stress-70 protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPA9 PE=1 SV=2
>sp P40939 ECHA_HUMAN Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HADHA PE=1 SV=2

>sp P49411 EFTU_HUMAN Elongation factor Tu, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=TUFM PE=1 SV=2
>sp P54886-2 P5CS_HUMAN Isoform Short of Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase OS=Homo sapiens GN=ALDH18A1
>sp P63261 ACTG_HUMAN Actin, cytoplasmic 2 OS=Homo sapiens GN=ACTG1 PE=1 SV=1
>sp Q5VTE0 EF1A3_HUMAN Putative elongation factor 1-alpha-like 3 OS=Homo sapiens GN=EEF1A1P5 PE=5 SV=1
>sp P81605 DCD_HUMAN Dermcidin OS=Homo sapiens GN=DCD PE=1 SV=2
>sp Q9HDC9 APMAP_HUMAN Adipocyte plasma membrane-associated protein OS=Homo sapiens GN=APMAP PE=1 SV=2

Πίνακας 17. Medium confident GR-interacting proteins. Μόρια μέτριας πιστότητας ως προς το χαρακτηρισμό τους ως mtGR αλληλεπιδρώντα μόρια.

Medium confident GR-interactive proteins
>sp Q99878 H2A1J_HUMAN Histone H2A type 1-J OS=Homo sapiens GN=HIST1H2AJ PE=1 SV=3
>sp P39656 OST48_HUMAN Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit OS=Homo sapiens GN=DDOST PE=1 SV=4
>sp P50454 SERPH_HUMAN Serpin H1 OS=Homo sapiens GN=SERPINH1 PE=1 SV=2
>sp P68371 TBB4B_HUMAN Tubulin beta-4B chain OS=Homo sapiens GN=TUBB4B PE=1 SV=1

Πίνακας 18. Low confident GR-interacting proteins. Μόρια χαμηλής πιστότητας ως προς το χαρακτηρισμό τους ως mtGR αλληλεπιδρώντα μόρια.

Low confident GR-interactive proteins
>tr J3QL24 J3QL24_HUMAN Pyrroline-5-carboxylate reductase 1, mitochondrial (Fragment) OS=Homo sapiens GN=PYCR1 PE=2 SV=1
>tr B7Z3Z9 B7Z3Z9_HUMAN Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1 OS=Homo sapiens GN=ACSL1 PE=2 SV=1
>tr D3DQ64 D3DQ64_HUMAN Adenylate kinase 4, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=AK4 PE=3 SV=1
>tr E7EQR6 E7EQR6_HUMAN T-complex protein 1 subunit alpha OS=Homo sapiens GN=TCP1 PE=2 SV=1
>tr E7ER27 E7ER27_HUMAN Peroxisomal multifunctional enzyme type 2 OS=Homo sapiens GN=HSD17B4 PE=2 SV=3
>tr F5GZS6 F5GZS6_HUMAN 4F2 cell-surface antigen heavy chain OS=Homo sapiens GN=SLC3A2 PE=2 SV=1
>tr F8W696 F8W696_HUMAN Truncated apolipoprotein A-I OS=Homo sapiens GN=APOA1 PE=2 SV=1
>tr F8W6P5 F8W6P5_HUMAN LVV-hemorphin-7 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=HBB PE=2 SV=1
>tr H7C218 H7C218_HUMAN Probable serine carboxypeptidase CPVL (Fragment) OS=Homo sapiens GN=CPVL PE=2 SV=1
>tr K7EPS5 K7EPS5_HUMAN Asialoglycoprotein receptor 1 (Fragment) OS=Homo sapiens GN=ASGR1 PE=4 SV=1

>sp O94925-3 GLSK_HUMAN Isoform 3 of Glutaminase kidney isoform, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=GLS
>sp O95573 ACSL3_HUMAN Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 3 OS=Homo sapiens GN=ACSL3 PE=1 SV=3
>sp P02810 PRPC_HUMAN Salivary acidic proline-rich phosphoprotein 1/2 OS=Homo sapiens GN=PRH1 PE=1 SV=2
>sp P06702 S10A9_HUMAN Protein S100-A9 OS=Homo sapiens GN=S100A9 PE=1 SV=1
>sp P15924 DESP_HUMAN Desmoplakin OS=Homo sapiens GN=DSP PE=1 SV=3
>sp P48449-2 ERG7_HUMAN Isoform 2 of Lanosterol synthase OS=Homo sapiens GN=LSS
>sp P51991 ROA3_HUMAN Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 OS=Homo sapiens GN=HNRNPA3 PE=1 SV=2
>sp P62805 H4_HUMAN Histone H4 OS=Homo sapiens GN=HIST1H4A PE=1 SV=2
>sp Q6UWP8 SBSN_HUMAN Suprabasin OS=Homo sapiens GN=SBSN PE=2 SV=2

#### 4.3.5 Κατηγοριοποίηση ως προς τη βιολογική δράση μορίων και απεικόνισή των μονοπατιών που συμμετέχουν με το πρόγραμμα DAVID Gene Functional Classification Tool.

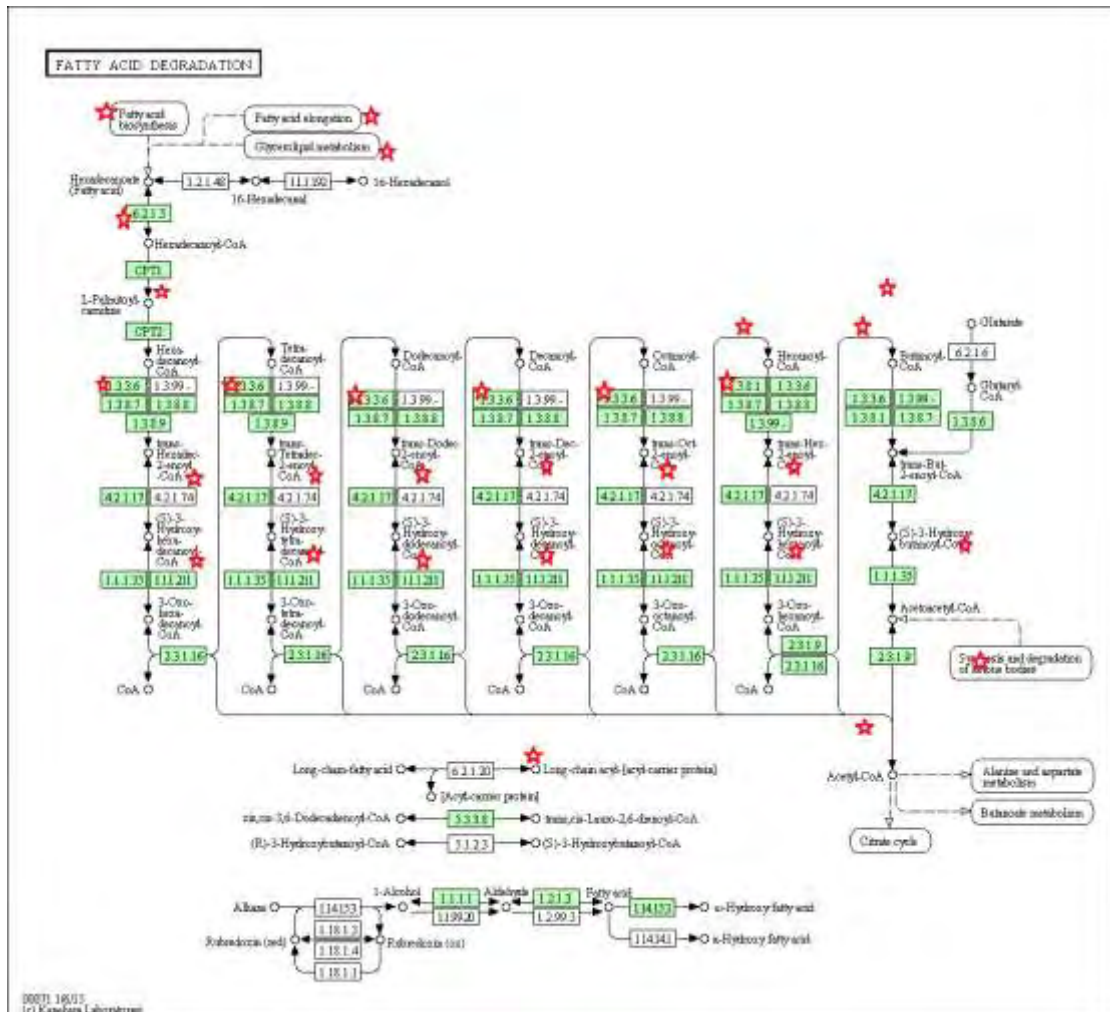
Με τη βοήθεια του προγράμματος DAVID Gene Functional Classification Tool προσδιορίστηκαν τα μονοπάτια στα οποία συμμετέχουν τα μόρια που προέκυψαν ως άμεσα ή/και έμμεσα αλληλεπιδρώντα μόρια με τον mtGR και από τις δύο πειραματικές προσεγγίσεις. Στις παρακάτω εικόνες παρατίθενται λεπτομερώς τα μονοπάτια καθώς και τα σημεία δράσεις των μορίων σε αυτά (επισημασμένα με κόκκινο αστερίσκο).

##### 4.3.5.1 Μεταβολισμός λιπαρών οξέων

Τα μόρια που ανιχνεύθηκαν και συμμετέχουν στον μεταβολισμό των λιπαρών οξέων είναι:

- acyl-coA synthetase long chain family member 1/ συνθετάση του ακυλο-coA μακριάς αλυσίδας της οικογένειας 1
- acyl-coA synthetase long chain family member 3/ συνθετάση του ακυλο-coA της μακριάς αλυσίδας της οικογένειας 3
- acyl-coA synthetase long chain family member 4/ συνθετάση του ακυλο-coA μακριάς αλυσίδας της οικογένειας 4
- acyl-Coenzyme A dehydrogenase, short/branched chain/ Αφυδρογονάση του ακυλο-coA, μικρή/διακλαδισμένης αλυσίδας
- acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain/ Αφυδρογονάση του ακυλο-coA, μακριάς αλυσίδας
- aldehyde dehydrogenase 1 family, member B1/ Αλδεϋδική αφυδρογονάση 1, B1

- hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), alpha subunit/ Αφυδρογονάση του L-3-υδροξυακυλο-coA/ β-Κετοθειολάση/ Υδατάση του ενοϋλο-coA (τριλειτουργική πρωτεΐνη), υπομονάδα α
- hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), beta subunit/ Αφυδρογονάση του L-3-υδροξυακυλο-coA/ β-Κετοθειολάση/ Υδατάση του ενοϋλο-coA (τριλειτουργική πρωτεΐνη), υπομονάδα β



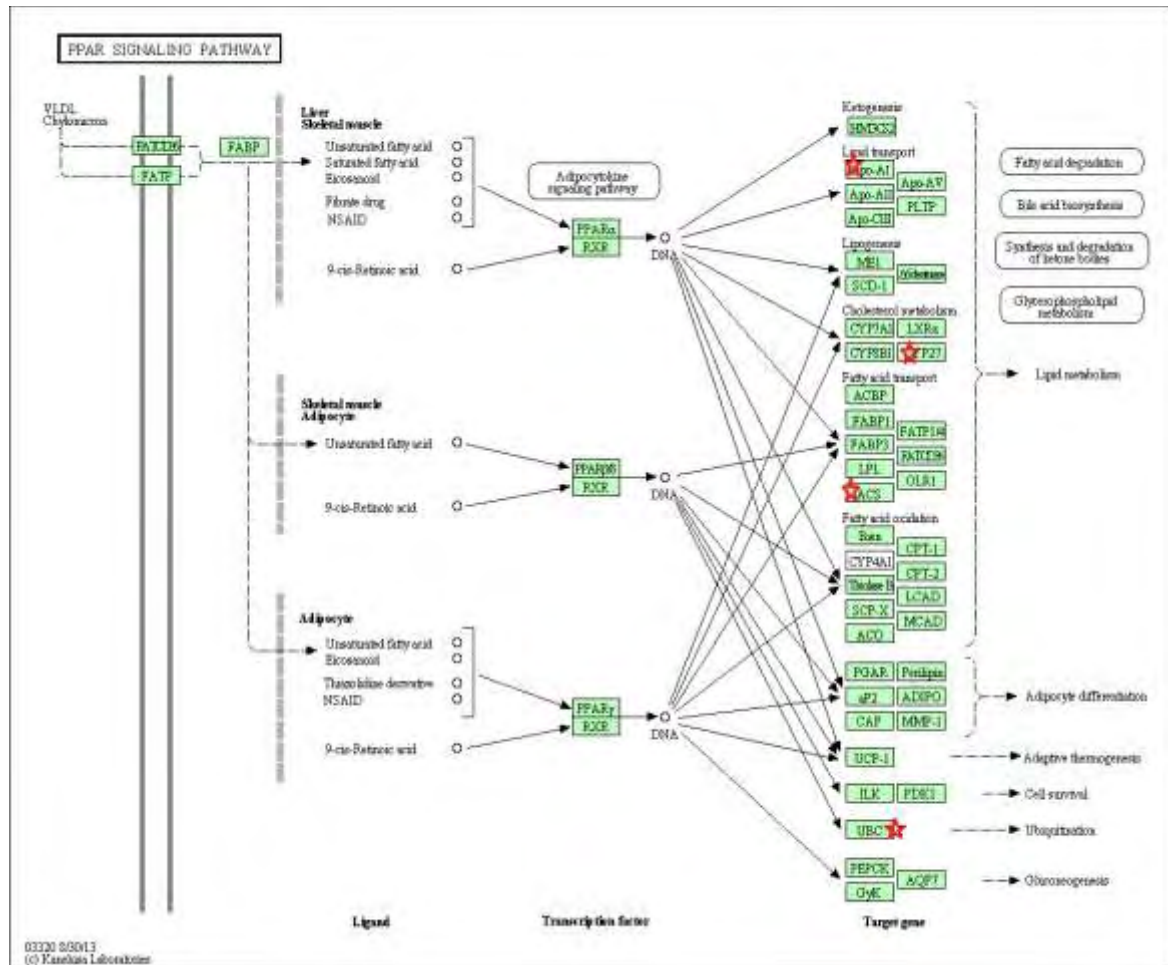
Εικόνα 19. Τα σημεία που συμμετέχουν άμεσα ή έμμεσα τα αλληλεπιδρώντα μόρια με τον mtGR στον μεταβολισμό των λιπαρών οξέων.

#### 4.3.5.2 Μονοπάτι σηματοδότησης PPAR

Τα αλληλεπιδρώντα με τον mtGR μόρια που ανιχνεύθηκαν και συμμετέχουν στο μονοπάτι σηματοδότησης PPAR είναι τα παρακάτω:

- acyl-coA synthetase long chain family member 1/ συνθετάση του ακυλο-coA μακριάς αλυσίδας της οικογένειας 1

- acyl-coA synthetase long chain family member 3/ συνθετάση του ακυλο-coA μακριάς αλυσίδας της οικογένειας 3
- acyl-coA synthetase long chain family member 4/ συνθετάση του ακυλο-coA μακριάς αλυσίδας της οικογένειας 4
- apolipoprotein A-I/ απολιποπρωτεΐνη A-I
- cytochrome P450, family 27, subfamily A, polypeptide 1/ κυτόχρωμα P450, οικογένεια 27, υποοικογένεια A, πολυπεπτίδιο 1
- ubiquitin C/ ουβικουτίνη C



**Εικόνα 20.** Το μονοπάτι σηματοδότησης των PPAR και τα σημεία δράσης των αλληλεπιδρώντων μορίων με τον mtGR.

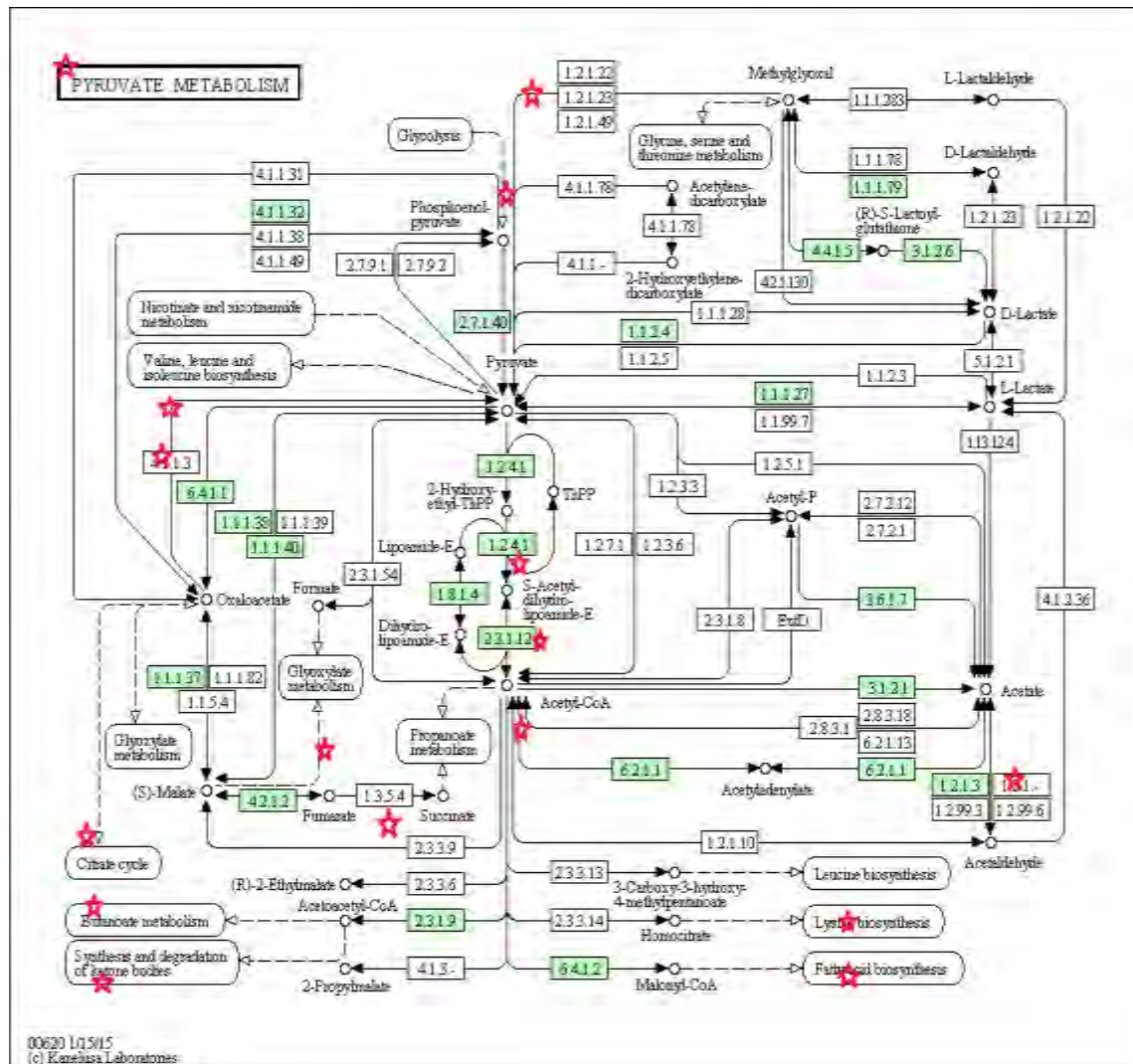
#### 4.3.5.3 Μεταβολισμός πυροσταφυλικού οξέος

Τα αλληλεπιδρώντα με τον mtGR μόρια που ανιχνεύθηκαν και συμμετέχουν στον μεταβολισμό του πυροσταφυλικού οξέος είναι τα παρακάτω:

- aldehyde dehydrogenase 1 family, member B1/ Αλδεϋδική αφυδρογονάση 1, B1
- dihydrolipoamide S-acetyltransferase/ διυδρολιποϋλο-τρανσακετυλάση
- pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha/ συνιστώσα α της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού οξέος



- pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta/ συνιστώσα β της αφυδρογονάσης του πυροσταφυλικού οξέος

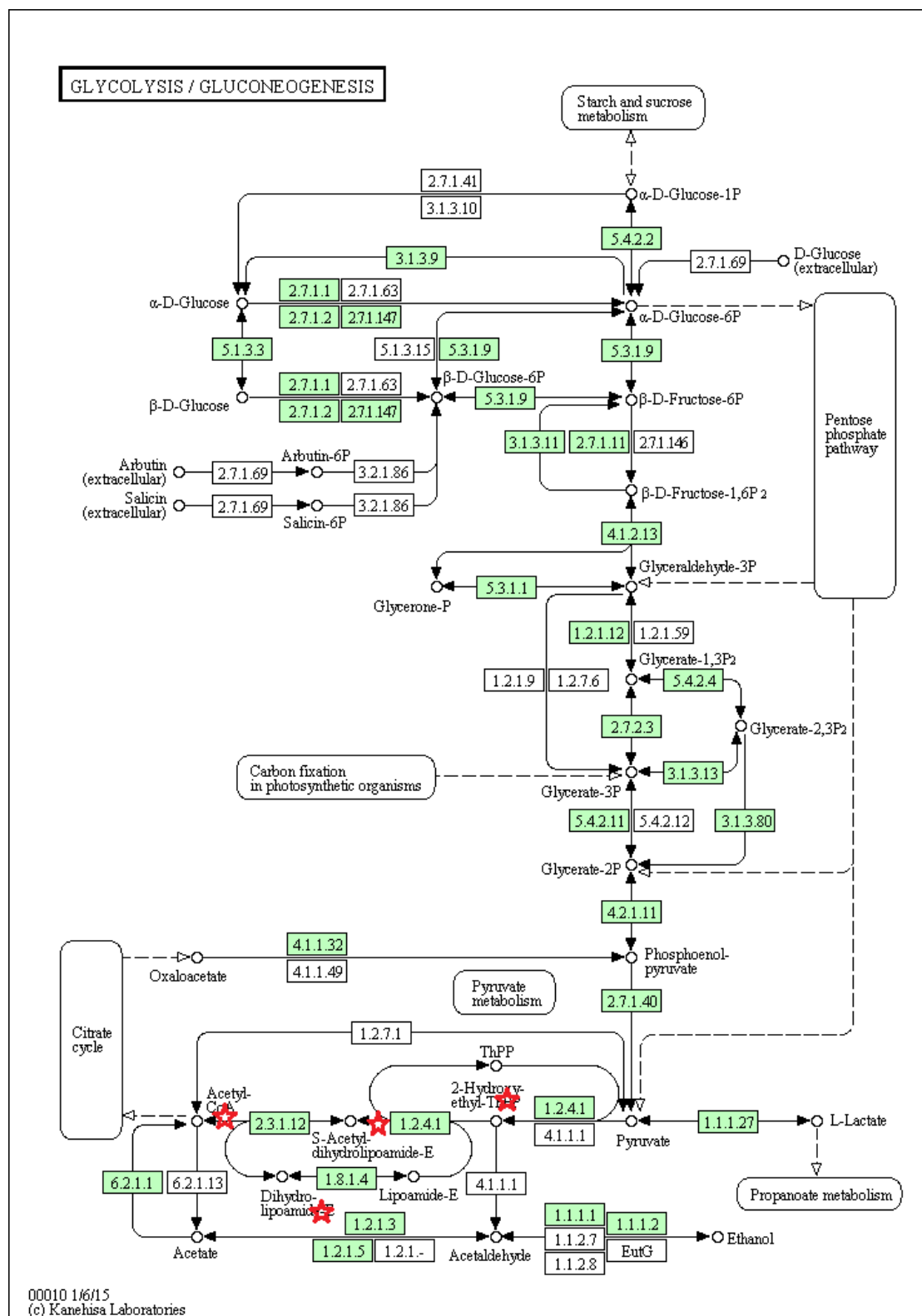


**Εικόνα 21. Ο μεταβολισμός του πυροσταφυλικού οξέος και τα σημεία δράσης των αλληλεπιδρώντων με τον mtGR μορίων.**

#### 4.3.5.4 Γλυκόλυση/Γλυκονεογένεση

Τα αλληλεπιδρώντα με τον mtGR μόρια που ανιχνεύθηκαν και συμμετέχουν άμεσα ή έμμεσα στην γλυκόλυση και γλυκονεογένεση είναι τα παρακάτω:

- aldehyde dehydrogenase 1 family, member B1/ Αλδεϋδική αφυδρογονάση 1, B1
- dihydrolipoamide S-acetyltransferase/ διυδρολιποϋλο-τρανσακετυλάση
- pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 1/ συνιστώσα α πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης
- pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta/ συνιστώσα β πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης

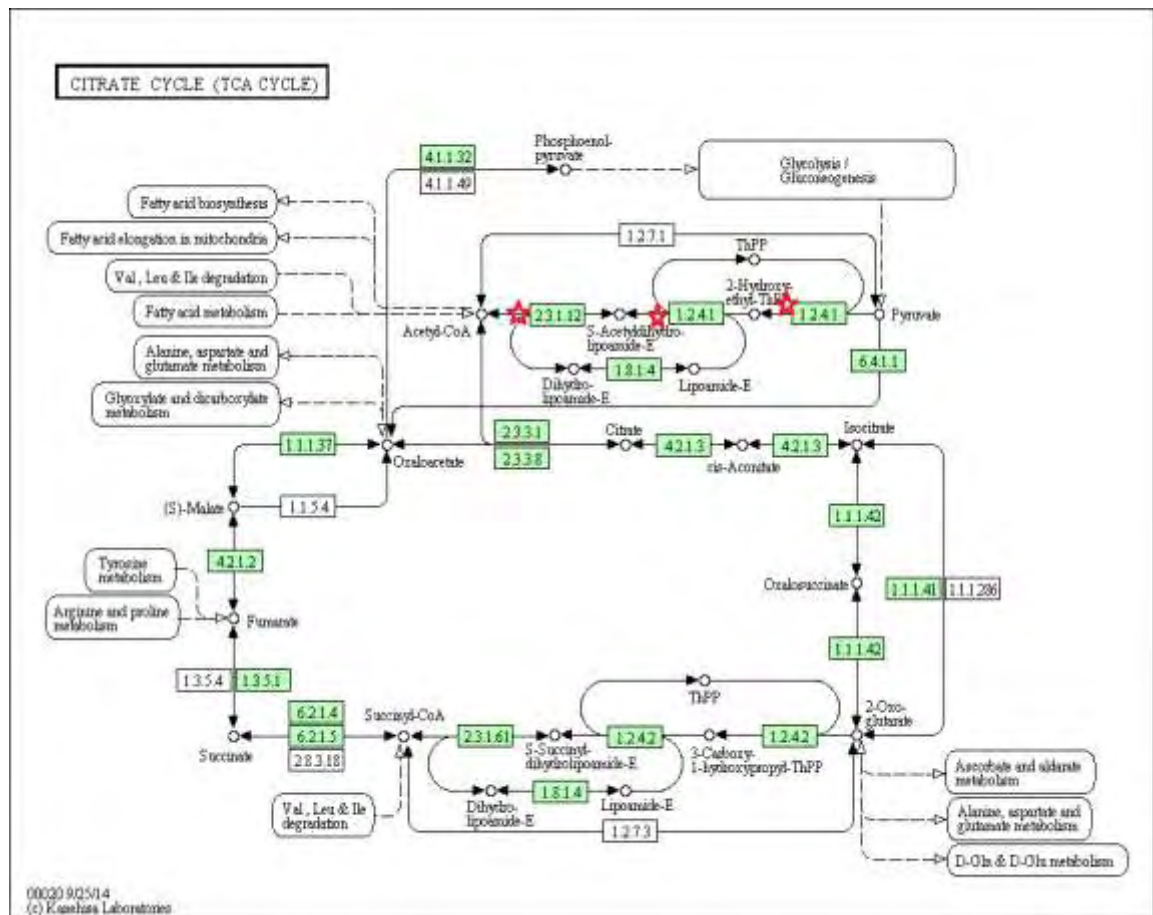


**Εικόνα 22. Οι διαδικασίες γλυκόλυση/γλυκονεογένεση και τα σημεία δράσης των ανιχνευθέντων αλληλεπιδρώντων μορίων με τον mtGR.**

#### 4.3.5.5 Κύκλος τρικαρβοξυλικών οξέων

Τα αλληλεπιδρώντα με τον mtGR μόρια που ανιχνεύθηκαν και συμμετέχουν στον κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων είναι τα παρακάτω:

- dihydrolipoamide S-acetyltransferase/ διυδρολιποϋλο-τρανσακετυλάση
- pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 1/ συνιστώσα πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης α
- pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta/ συνιστώσα πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης β

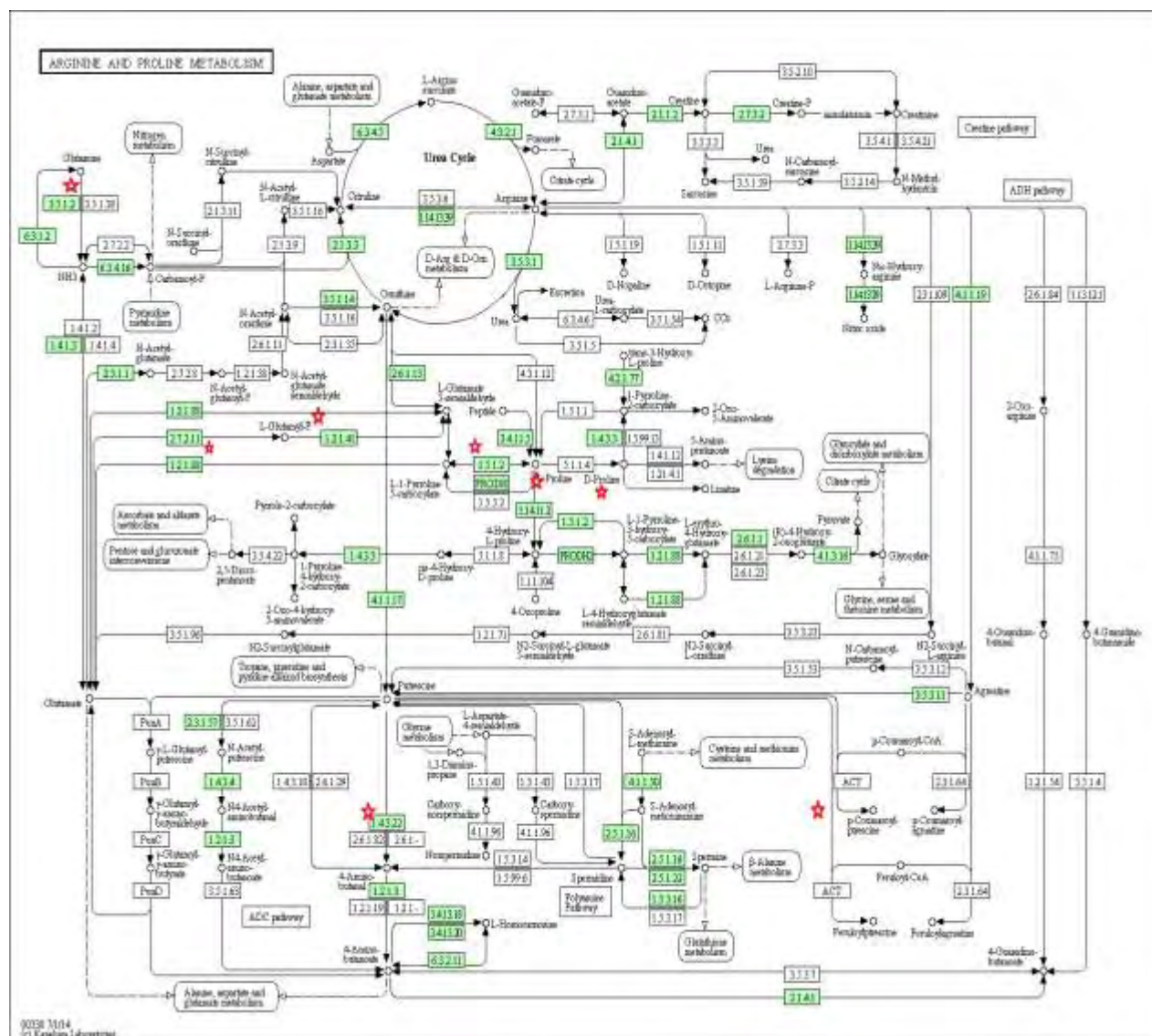


**Εικόνα 23. Ο κύκλος του κιτρικού οξέος και τα σημεία δράσης των ανιχνευθέντων αλληλεπιδρώντων μορίων με τον mtGR.**

#### 4.3.5.6 Μεταβολισμός αργινίνης και προλίνης

Τα αλληλεπιδρώντα με τον mtGR μόρια που ανιχνεύθηκαν και συμμετέχουν στον μεταβολισμό αργινίνης και προλίνης είναι τα παρακάτω:

- aldehyde dehydrogenase 1 family, member B1/ αλδευδική αφυδρογονάση 1, B1
- aldehyde dehydrogenase 18 family, member A1 αλδευδική αφυδρογονάση 18, A1
- glutaminase/ γλουταμινάση
- prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide I/ 4-προπυλ-υδροξυλάση, α I
- pyrroline-5-carboxylate reductase 1/ αναγωγή 1 της 5-υδροξυπρολίνης



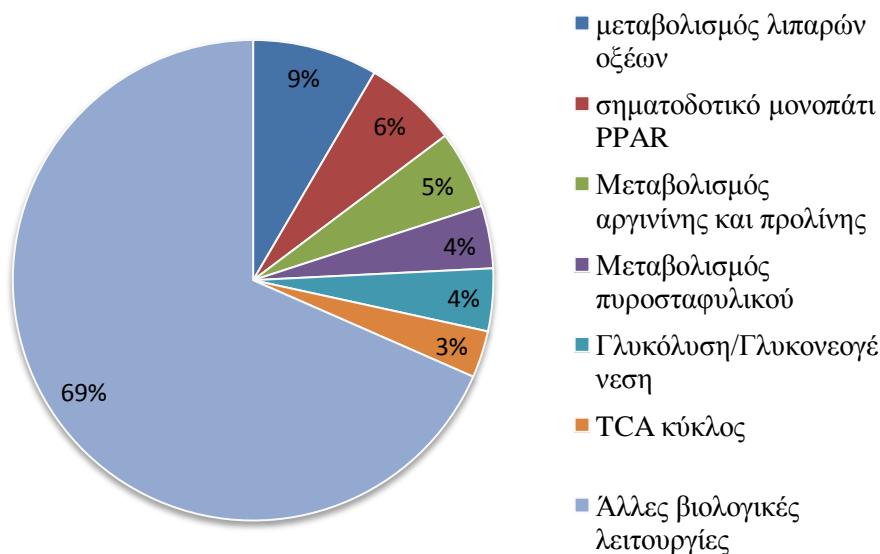
**Εικόνα 24. Ο μεταβολισμός αργινίνης και προλίνης και τα σημεία δράσης των ανιχνευθέντων αλληλεπιδρώντων μορίων με τον mtGR.**

#### 4.3.6 Διαγραμματική απεικόνιση όλων των μορίων που αλληλεπιδρούν με τον mtGR.

Παρακάτω παρουσιάζεται μία διαγραμματική απεικόνιση των μορίων που φαίνεται να εμπλέκονται είτε άμεσα είτε έμμεσα με τον μιτοχondριακό υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών. Με τον όρο ‘άλλες βιολογικές λειτουργίες’ συνοψίζονται ποικίλλες κατηγορίες λειτουργιών που συμμετέχουν μόρια που αλληλεπιδρούν με τον mtGR, όπως η τροποποίηση πρωτεϊνών (μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, αλλαγή αναδίπλωσης πρωτεϊνών, μεταφορά πρωτεϊνών κα), κυτταρική ομοιόσταση, συναρμολόγηση κυτταρικών συμπλόκων, συνοδοί πρωτεΐνες, αποπτωτικές πρωτεΐνες κα.



**Τα μόρια που εμπλέκονται άμεσα και έμμεσα με τον mtGR και ο βιολογικός τους ρόλος.**



**Εικόνα 25. Διαγραμματική απεικόνιση μορίων που εμπλέκονται είτε άμεσα είτε έμμεσα με τον mtGR και η επί % συσχέτιση της βιολογικής τους δράσης.**

## 5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι ισομορφές του GR εκφράζονται σχεδόν σε όλους τους κυτταρικούς τύπους και η σηματοδότηση των γλυκοκορτικοειδών είναι παντού επικρατούσα στα οργανικά συστήματα του οργανισμού. Τα φυσικά και συνθετικά γλυκοκορτικοειδή υλοποιούν τις δράσεις τους μέσω σύνδεσής τους στον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR). Απουσία γλυκοκορτικοειδών, ο GR εδρεύει στο κυτταρόπλασμα δεσμευμένος με συνοδές πρωτεΐνες, σχηματίζοντας το σύμπλοκο του από-υποδοχέα. Με την σύνδεση της ορμόνης, ο GR υφίσταται διαμορφωτικές αλλαγές που πυροδοτούν την μεταφορά αυτού και του συνδεδεμένου προσδέματος στον πυρήνα. Σε αυτό το περιβάλλον, ο GR μπορεί να ασκήσει τις δράσεις του κυρίως με γενωμικούς (trans-ενεργοποίηση και trans-καταστολή) μηχανισμούς, που περιλαμβάνουν την άμεση πρόσδεση υψηλής συγγένειας σε στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (GREs), τα οποία βρίσκονται είτε σε προαγωγείς είτε σε ενδογονιδιακές περιοχές συγκεκριμένων γονιδίων στόχων. Ο GR είναι προϊόν ενός μοναδικού γονιδίου, NR3C1, εντοπισμένο στο χρωμόσωμα 5q31-32 στους ανθρώπους, το οποίο υφίσταται εναλλακτικό μάτισμα είτε εναλλακτική έναρξη της μεταγραφγραφής ώστε να παραγάγει ποικίλους λειτουργικά και διακριτούς υπότυπους του GR. Η ποικιλότητα των οδών σηματοδότησης του GR προέρχεται από τα διαφορετικά GREs και τις ισομορφές του υποδοχέα που γεννούνται από εναλλακτικό μάτισμα και εναλλακτική έναρξη της μετάφρασης.

Επιπρόσθετα, μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις συμπεριλαμβανομένου της φωσφορυλίωσης, ακετυλίωσης, ουβικουιτίνωσης και σουμυλίωσης μπορούν να προκαλέσουν αλλαγές στην λειτουργία του συγκεκριμένου μεταγραφικού παράγοντα (Kadmiel M., Cidlowski J., 2013).

Η ορμονική κινητοποίηση της μεταγραφικής, μετα-μεταγραφικής και μεταφραστικής μηχανής του κυττάρου απαιτεί υψηλή κατανάλωση ενέργειας, γι αυτό το λόγο είναι λογικό ότι μεταξύ των πρωτεϊνών που επάγονται από τα γλυκοκορτικοειδή, συγκαταλέγονται ένζυμα που εμπλέκονται στην παραγωγή ενέργειας, όπως τα OXPHOS. Είναι γενικά αποδεκτός ο έμμεσος τρόπος με τον οποίο τα γλυκοκορτικοειδή ελέγχουν τη μεταγραφή γονιδίων των OXPHOS, τόσο με την επίδραση της ορμόνης σε πυρηνικά OXPHOS γονίδια όσο και σε πυρηνικούς μεταγραφικούς παράγοντες που μεταγενέστερα εισέρχονται στο μιτοχόνδριο και επάγουν τη μιτοχονδριακή μεταγραφή. Η παρουσία του GR στα μιτοχόνδρια και των παρόμοιων με τα πυρηνικά στοιχεία GREs αλληλουχιών στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα, μαρτυρούν έναν επιπρόσθετο άμεσο ρόλο του mtGR στη μεταγραφή του μιτοχονδριακού γονιδιώματος που συμβάλλει στην παραγωγή των μιτοχονδριακά κωδικοποιημένων υπομονάδων των συμπλόκων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στο υποκυτταρικό αυτό διαμέρισμα. Η άμεση δράση του GR στο μιτοχόνδριο εξασφαλίζει τον καλύτερο συντονισμό της έκφρασης των πυρηνικά και μιτοχονδριακά κωδικοποιημένων υπομονάδων ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας - οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, συντελώντας έτσι στην ενορχήστρωση της βιοσύνθεσης των OXPHOS ενζύμων και στην εξασφάλιση μηχανισμών παραγωγής ενέργειας (Psarra και Sekeris 2011).

Δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας υποδεικνύουν επίσης την εμπλοκή του GR και σε άλλες μιτοχονδριακά σχετιζόμενες βιοχημικές διεργασίες όπως παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου, ρύθμιση αποπτωτικών μηχανισμών (Sionov, R. V et al, 2006) και ανοσολογικές αποκρίσεις (Psarra Biochem J 2009).

Παρά τα μέχρι σήμερα δεδομένα σχετικά με το μιτοχονδριακό GR, η βιολογική δράση του GR στα μιτοχόνδρια καθώς και οι μηχανισμοί εισόδου του στα μιτοχόνδρια παραμένουν ένα νέο αντικείμενο έρευνας που χρήζει εκτενή μελέτη. Ο χαρακτηρισμός του βιολογικού ρόλου του GR στα μιτοχόνδρια και η διαλεύκανση του μηχανισμού εισόδου και στόχευσης του σε αυτά αποτελούν τα τελευταία χρόνια αντικείμενο έρευνας του εργαστηρίου μας.

Με σκοπό την διαλεύκανση των δράσεων του mtGR και του ακριβή μηχανισμού επιτέλεσης αυτών το εργαστήριο μας τα τελευταία χρόνια είχε θέσει σαν στόχο τον χαρακτηρισμό των μορίων που αλληλεπιδρούν με το GR στο μιτοχονδριακό περιβάλλον. Η πειραματική προσέγγιση που εφαρμόστηκε για την απάντηση αυτού του ερωτήματος ήταν η μέθοδος της ανοσοκατακρήμνισης συνδυασμένη τόσο με τη μέθοδο της φασματοσκοπίας μάζας όσο και με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής ήταν τόσο η επαλήθευση όσο και ο εμπλουτισμός των αποτελεσμάτων προηγούμενων μελετών εφαρμόζοντας τη μέθοδο

της φασματοσκοπίας μάζας για τον χαρακτηρισμό των πρωτεϊνών που συγκατακρημνίζονται με τον υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών σε μιτοχονδριακό εκχύλισμα ηπατοκαρκινικών κυττάρων HepG2 που είχαν μετασχηματιστεί και παρασκευαστεί στο εργαστήριο μας, ώστε να υπερεκφράζουν μόνιμα τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών με μιτοχονδριακή στόχευση.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι ο mtGR συνκατακρημνίζεται με μόρια όπως η  $\beta$ -Κετοθειολάση, η συνθετάση του ακυλο-coA μακριάς αλυσίδας της οικογένειας I και το τριλειτουργικό σύμπλοκο: *hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein)*, *alpha subunit/ Αφυδρογονάση του L-3-υδροξυακυλο-coA/  $\beta$ -Κετοθειολάση/ Υδατάση του ενοϋλο-coA (τριλειτουργική πρωτεΐνη)*, υπομονάδα  $\alpha$  και υπομονάδα  $\beta$ , *ATP synthase subunit beta/ υπομονάδα  $\beta$  της ATP συνθάσης*, που συμμετέχουν σε διάφορες άμεσα ή έμμεσα σχετιζόμενες μιτοχονδριακές λειτουργίες όπως παραγωγή ενέργειας, μεταβολισμός λιπαρών οξέων, και άλλων μορίων όπως *Pyrroline-5-carboxylate reductase/ αναγωγή της 5-καρβοξυλοπυρρολίνης, Isoform 3 of Glutaminase kidney/ ισομορφή 3 της γλουταμινάσης* και, που συμμετέχουν στον μεταβολισμό αμινοξέων. Επίσης, ανιχνεύθηκαν μόρια που παίζουν ρόλο στις τροποποιήσεις των πρωτεϊνών, όπως η *78 kDa glucose-regulated protein/ πρωτεΐνη ρυθμιζόμενη από γλυκόζη M.B. 78 kDa, Endoplasmin/ Ενδοπλασμίνη* και *Desmoplakin/ Δεσμοπλακίνη*.

Ενδεικτικά αναφέρονται μόρια όπως *Isoform 3 of Pyruvate dehydrogenase protein X component/ Ισομορφή 3 της Πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης συστατικού X, Isoform 3, 2 of Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha/ ισομορφή 3 και 2 της συνιστώσας της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης E1, Isoform 3 of Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1/ Ισομορφή 3 της υπομονάδας  $\alpha 1$  της Na/K ATPase, ATP synthase subunit alpha-beta/ Υπομονάδες  $\alpha$  και  $\beta$  της μιτοχονδριακής ATPάσης*, που συμμετέχουν στη διαδικασία μεταβολισμού πυροσταφυλικού και αναπνευστικής αλυσίδας-οξειδωτικής φωσφορύλιωσης. Επιπρόσθετα, χαρακτηρίστηκαν μόρια που έχουν αποπτωτικές ιδιότητες: *Tubulin beta chain/ Τουμπουλίνη  $\beta$  αλυσίδας* και *Endoplasmin/ Ενδοπλασμίνη* καθώς και μόρια με αντι-αποπτωτικές ιδιότητες: *Stress-70 protein, mitochondrial/ Μιτοχονδριακή πρωτεΐνη stress-70*. Τα μόρια αυτά ανιχνεύονται ως υψηλής πιστότητας αλληλεπιδρώντα μόρια με τον mtGR (high confident interacting molecules) σύμφωνα με την DFQ ανάλυση και αποτελούν στο σύνολο τους το 30 % του συνόλου των μορίων που χαρακτηρίστηκαν ως άμεσα ή έμμεσα mtGR αλληλεπιδρώντα μόρια, σύμφωνα με την ανάλυση “David”.

Ο χαρακτηρισμός αυτών των μορίων υποδεικνύει άγνωστες μέχρι σήμερα δράσεις του mtGR όπως αυτήν του μεταβολισμού των λιπαρών οξέων και υποδηλώνει ένα σημαντικό ρόλο του mtGR στην παραγωγή και περαιτέρω μεταβολισμό του ακέτυλο συνενζύμου Α είτε αυτό προέρχεται από το μεταβολισμό των υδατανθράκων είτε από το μεταβολισμό των λιπαρών οξέων.

Ιδιαίτερα μάλιστα η επαλήθευση και περαιτέρω εμπλουτισμός της παρατήρησης της αλληλεπίδρασης, άμεσης ή έμμεσης του mtGR, με συστατικά του συμπλόκου της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης υποδηλώνει ένα κρίσιμο ρόλο του mtGR στη ρύθμιση της μεταβολικής στροφής των φυσιολογικών κυττάρων προς καρκινικά γνωστής ως φαινόμενο Warburg.

Επιπλέον η επαλήθευση της παρατήρησης της αλληλεπίδρασης του mtGR με συνοδές πρωτεΐνες όπως *Heat shock protein 75 kDa mitochondrial/ μιτοχονδριακή πρωτεΐνη θερμικού σοκ 75 kDa* και *60 kDa heat shock protein, mitochondrial/ μιτοχονδριακή πρωτεΐνη θερμικού σοκ 60 kD*, που είναι γνωστό ότι εμπλέκονται σε μηχανισμούς υποκυτταρικής και ιδιαίτερα μιτοχονδριακής στόχευσης πρωτεϊνών ρίχνει φως στους μηχανισμούς εισόδου του υποδοχέα στα μιτοχόνδρια.

## **6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- Alangari A. A., Genomic and non-genomic actions of glucocorticoids in asthma, *Ann Thorac Med.* 2010 Jul-Sep; 5(3): 133–139
- Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., *Essential Cell Biology*, Chapter 16: Cell Communication, Garland Science, 2010).
- Aranda A. and Pascual A., Nuclear hormone receptors and gene expression, *Physiological Reviews*, 2001, 81, 1269-1304
- Baba AI., Câtoi C., *Comparative Oncology*, Chapter 3TUMOR CELL MORPHOLOGY, Bucharest: The Publishing House of the Romanian Academy; 2007.
- Bantscheff M., Schirle M., Sweetman G., Rick J. and Kuster B., Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review, *Anal Bioanal Chem* (2007) 389:1017–103.
- Berg J. M., Tymoczko J. L., and Stryer L., *Biochemistry*, Fifth Edition, W. H. Freeman and Company, 2001,2002
- Biddie S. C., Conway-Campbell B. L., and Lightman S. L., Dynamic regulation of glucocorticoid signalling in health and disease, *Rheumatology* (Oxford). Mar 2012; 51(3): 403–412.
- Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem*, 72, 248–254 (1976)
- Chevallet M., Luche S., and Rabilloud T., Silver staining of proteins in polyacrylamide gels, *Nat Protoc.* 2006; 1(4): 1852–1858.
- Deroo J B. and Archer K T., Glucocorticoid receptor-mediated chromatin remodeling in vivo, *Oncogene* (2001), Nature Publishing Group, 2001
- Dittmar K. D., Banach M., Galigniana M. D. and Pratt W. B., The Role of DnaJ-like Proteins in Glucocorticoid Receptor·hsp90 Heterocomplex



- Assembly by the Reconstituted hsp90·p60·hsp70 Foldosome Complex, *J. Biol. Chem.* 1998, 273:7358-7366.
- Dakubo G. D., Mitochondrial Genetics and Cancer, Springer Science & Business Media, 2010, 3642114164, 9783642114168
  - Encío IJ, Detera-Wadleigh SD, The genomic structure of the human glucocorticoid receptor, *J Biol Chem.* 1991 Apr 15;266(11):7182-8.
  - Formenti F., Dumitru C.T., [...], and Robbins P.A., Regulation of human metabolism by hypoxia-inducible factor, Published online Jun 28, 2010, PMID: PMC2906567
  - Huang D. W., Sherman B. T., Tan Q., Collins J. R., Alvord G. R., Roayaei J., Stephens R., Baseler M. W., Lane C. H., Lempicki R. A., The DAVID Gene Functional Classification Tool: a novel biological module-centric algorithm to functionally analyze large gene lists, *Genome Biol.* 2007; 8(9): R183).
  - Hudson W.H., Youn C. and Ortlund E. A., The structural basis of direct glucocorticoid-mediated transrepression, *Nat Struct Mol Biol.* Jan 2013; 20(1): 53–58.
  - Ismaili N, Garabedian MJ. 2004. Modulation of glucocorticoid receptor function via phosphorylation. *Ann NY Acad Sci*, 1024:86–101.
  - Jung-whan K. and Chi V. D., Cancer's Molecular Sweet Tooth and the Warburg Effect, *Cancer Res* 2006; 66: (18). September 15, 2006
  - Kadmiel M., Cidlowski J. A., Glucocorticoid receptor signaling in health and disease, 2013.
  - Knudson AG (November 2001). "Two genetic hits (more or less) to cancer". *Nature Reviews Cancer* 1 (2): 157–62. doi:10.1038/35101031. PMID 11905807.
  - Krauss G., Biochemistry of Signal Transduction and Regulation, Chapter 4: Signaling by Nuclear Receptors, WILEY-VCH, 2003
  - Krauss Stefan, Mitochondria: Structure and Role in Respiration, *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES* / & 2001 Nature Publishing Group / www.els.net
  - Kumar R. and Calhoun W. J, Differential regulation of the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor through site-specific phosphorylation, *Biologics: Targets & Therapy* 2008;2(4) 845–854
  - Labeur M, Arzt E, Stalla GK, Páez-Pereda M., New perspectives in the treatment of Cushing's syndrome. *Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders.* 2004;4:335-342
  - Mangelsdorf D. J., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Umesono G. S. K., Blumberg B., Kastner P., Mark M., Chambon P., and Evans R. M., The Nuclear Receptor Superfamily: The Second Decade, *Cell*, Vol. 83, 835-839, December 15, 1995.
  - McFate T., Mohyeldin A., Lu H., Thakar J., Henriques J., Halim N. D., Hong W., Schell M. J., Tsang T. M., Teahan O., Zhou S., Califano J. A., Jeoung N. H., Harris R. A., and Verma A., Pyruvate Dehydrogenase Complex

Activity Controls Metabolic and Malignant Phenotype in Cancer Cells, JBC Papers in Press, June 9, 2008, DOI 10.1074/jbc.M801765200

- McKay L. I. and Cidlowski J. A., Physiologic and Pharmacologic Effects of Corticosteroids, in Holland-Frei Cancer Medicine, 6th edition, Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. Hamilton (ON): BC Decker; 2003.
- McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW, Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology, Endocrine Reviews, 1999
- Meijsing S. H., Pufall M. A., So S. Y., Bates D. L., Chen L., and Yamamoto K. R., DNA Binding Site Sequence Directs Glucocorticoid Receptor Structure and Activity, Science. 2009, 324(5925): 407–410.
- Nussey S, Whitehead S. Endocrinology: An Integrated Approach. Chapter 1, Principles of endocrinology. Oxford: BIOS Scientific Publishers; 2001.
- Ortsater H., Sjöholm E., and Rafacho A., Regulation of Glucocorticoid Receptor Signaling and the Diabetogenic Effects of Glucocorticoid Excess, in Magdeldin Sameh, (2012), "State of the Art of Therapeutic Endocrinology", ISBN 978-953-51-0772-9,
- Psarra, A.M.G., Sekeris, C.E. (2008). Steroid and thyroid Hormone Receptors in Mitochondria. IUMBM Life 60, 210-223
- Psarra A.M.G., Sekeris C.E., Glucocorticoid receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria and possible functions, Biochim. Biophys. Acta 1787 (2009)
- Psarra, A.M.G., Sekeris, C.E. (2011). Glucocorticoids induce mitochondrial gene transcription in HepG2 cells role of the mitochondrial glucocorticoid receptor. Biochim. Biophys. 10, 1814-1821
- Reichardt H.M., Kaestner K.H., Tuckermann J., Kretz O., Wessely O., Bock R., Gass P., Schmid W., Herrlich P., Angel P., Schutz G. DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. Cell. 1998;93:531–541.
- Savory J. G. A., Pre Fontaine G. G., Lamprecht C., Liao M., Walther R. F., Lefebvre Y. A., and Hache R. J. G., Glucocorticoid Receptor Homodimers and Glucocorticoid-Mineralocorticoid Receptor Heterodimers Form in the Cytoplasm through Alternative Dimerization Interfaces, Molecular and Cellular Biology, Feb. 2001.
- Shao D. and Lazar M. A., Modulating nuclear receptor function: may the phos be with you., J Clin Invest 103: 1617–1618, 1999.
- Sionov R. V., 1, Cohen O., Kfir F., Zilberman Y., Yefenof E., Role of mitochondrial glucocorticoid receptor in glucocorticoid-induced apoptosis, JEM vol. 203 no. 1 189-201, 2006.
- Sparkman O. D., Mass spectrometry desk reference, 2000, Pittsburgh: Global View Pub. ISBN 0-9660813-2-3
- Taanman J. W., The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication, Biochimica et Biophysica Acta 1410 (1999)

- Tuckermann J. P., Reichardt H. M., Arribas R., Richter K. H., Schütz G., Angela P., The DNA Binding-Independent Function of the Glucocorticoid Receptor Mediates Repression of Ap-1–Dependent Genes in Skin, *J Cell Biol.* Dec 27, 1999; 147(7): 1365–1370.
- Vandevyver S., Dejager L., and Libert C., On the Trail of the Glucocorticoid Receptor: Into the Nucleus and Back, *Traffic* 2012; 13: 364–374.
- Weinberg R. A., *The Biology of Cancer*, 2nd Edition, Garland Science, 2014.
- Wurtz J. M., Bourguet W., Renaud J.P., Vivat V., Chambon P., Moras D., and Gronemeyer H., A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors., *Nat Struct Biol* 3: 87–94, 1996.